INSTITUUT VOOR PLANTENZIEKTENKUNDIG ONDERZOEK
WAGENINGEN, NEDERLAND
DIRECTEUR: Dr J. G. TEN HOUTEN

MEDEDELING No 46

VIRUSZIEKTEN BIJ CHRYSANTEN IN NEDERLAND

WITH A SUMMARY

VIRUS DISEASES OF CHRYSANTHEMUM INDICUM IN THE NETHERLANDS

DOOR

Dr D. NOORDAM

OVERDRUK UIT
„TIJDSCHRIFT OVER PLANTENZIEKTEN", 58: 121-190, 1952

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
20 JAN 1953

INSTITUUT VOOR PLANTENZIEKTENKUNDIG ONDERZOEK (I.P.O.)

Office and main laboratory: Binnenhaven 4*a*, tel. 2151, Wageningen, Netherlands.

Staff:

Director: Dr J. G. TEN HOUTEN.
Head of the Entomological Dept.: Dr H. J. DE FLUITER, Wageningen.
Head of the Virological Dept.: Prof. Dr T. H. THUNG, Wageningen.
Head of the Mycological Dept.: Dr J. G. TEN HOUTEN, Wageningen.
Head of the Plant Disease Resistance Dept.: Dr J. C. s'JACOB, Wageningen.

Researchworkers at the Wageningen Laboratory:

Ir G. J. ANKERSMIT, Entomologist
Miss Ir M. BAKKER, Phytopathologist
Ir A. B. R. BEEMSTER, Virologist
Ir A. M. VAN DOORN, Phytopathologist
Dr H. J. DE FLUITER, Entomologist
Dr J. GROSJEAN, Phytopathologist
Dr J. C. s'JACOB, Phytopathologist and plantbreeder
Miss Dr C. H. KLINKENBERG, Phytopathologist
Miss Dra J. M. KRIJTHE, Phytopathologist
Ir R. E. LABRUYÈRE, Phytopathologist
Dr J. C. MOOI, Phytopathologist
Dr D. MULDER, Phytopathologist
Miss Dra F. QUAK, Phytopathologist
Miss Dra J. C. SCHREUDER, Phytopathologist
Dr Ir J. W. SEINHORST, Nematologist
Prof. Dr T. H. THUNG, Virologist
Ir J. P. H. VAN DER WANT, Virologist

Researchworkers elsewhere:

Dr Ir J. J. FRANSEN, Entomologist. Velperweg 55, Arnhem, Tel. 22041.
Dr S. LEEFMANS, Entomologist, Head of the „Entomologisch Lab. I.P.O.", Mauritskade 59*a*, Amsterdam-O, tel. 56282.
Dr Ir C. J. H. FRANSSEN, Entomologist; Drs D. J. DE JONG, Entomologist; Drs L. E. VAN 'T SANT, Entomologist — „Entomologisch Lab. I.P.O.", Mauritskade 59*a*, A'dam-O, tel. 56282.
Ir H. A. VAN HOOF, Phytopathologist, Veilinggebouw Broek op Langendijk, tel. K 2267–341.
Dr W. J. MAAN, Entomologist, van IJsselsteinlaan 7, Amstelveen, tel. 2451.
Drs H. H. EVENHUIS, Entomologist; Ir G. S. ROOSJE, Phytopathologist — Detached to „Zeeland's Proeftuin", Wilhelminadorp, tel. 2261.
Dr D. NOORDAM, Phytopathologist, detached to „Proeftuin voor de Bloementeelt" Aalsmeer, tel. 688.
Dr F. TJALLINGII, Phytopathologist/Virologist, detached to „Proeftuin Noord Limburg" Venlo, tel. K 4700–2503.

Guest workers:

Dr Ir J. B. M. VAN DINTHER, Entomologist, „Lab. voor Entomologie", University, Wageningen, tel. 2438.
Prof. Dr D. J. KUENEN, Entomologist, „Zoölogisch Laboratorium", University, Leiden, tel. 20259.
Dr Ir G. S. VAN MARLE, Entomologist, Jacob Damsingel 22, Zutphen, tel. 3617.
Dr J. DE WILDE, Entomologist, „Physiologisch Laboratorium", University Amsterdam, tel. 47151.

Aphidological Adviser:

Mr D. HILLE RIS LAMBERS, Entomologist T.N.O., Bennekom, tel. 458.

SAMENVATTING

Van bijna 400 viruszieke planten behorende tot 116 variëteiten van *Chrysanthemum indicum* zijn de ziekteverschijnselen bestudeerd en van verschillende variëteiten beschreven, terwijl tevens op toetsplanten is nagegaan welke viren in deze zieke planten aanwezig waren.

Twee viren bleken veel voor te komen, namelijk:

1. Een virus dat in de loop van het onderzoek geïdentificeerd werd als een stam van *Cucumis virus 1* [1]), en hier *Cucumis virus 1 st. Chr.* genoemd is. Deze stam van *Cucumis virus 1* is in reeds eerder verschenen publicaties, toen het nog niet geïdentificeerd was, virus a genoemd.

2. Een onbekend virus, dat is aangeduid met *virus b*.

Bovendien werd, zij het in mindere mate ook *stuntvirus* aangetroffen, terwijl een vierde virus, aangeduid als *virus c*, slechts in één chrysant gevonden werd.

Cucumis virus 1 st. Chr. werd gevonden in chrysanten, bij welke altijd ziekteverschijnselen waren te constateren. De verschijnselen liepen sterk uiteen, waardoor een algemeen ziektebeeld ontbrak.

Virus b vertoonde, zij het in andere chrysanten-variëteiten, soortgelijke ziekteverschijnselen als *Cucumis virus 1 st. Chr.*, maar kwam ook voor in vele chrysanten-variëteiten zonder duidelijke ziekteverschijnselen te veroorzaken. Het meest opvallende ziekteverschijnsel bij *stuntvirus* is groeiremming. Zie Fig. 1 tot 19.

I. Cucumis virus 1 st. chr.

Cucumis virus 1 st. Chr. was door inoculatie met sap op 17 van 35 onderzochte plantensoorten over te brengen. Van deze planten zijn *Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum* en *Petunia hybrida nana compacta* zeer geschikt als toetsplanten te gebruiken.

Van het „type” van *Cucumis virus 1* verschilde de stam, die in chrysanten voorkomt, o.a. doordat deze op augurk (*Cucumis sativus*) vrijwel geen reactie veroorzaakte, en bij *Nicotiana glutinosa* en *Petunia hybrida* een sterke bladmisvorming en -versmalling teweegbracht.

Sap van tabaksbladeren, geïnoculeerd met *Cucumis virus 1 st. Chr.* gaf in een verdunning van 1 : 1000 tot zelfs 1 : 1.000.000 nog een reactie op de toetsplanten. Na verhitting gedurende 10 minuten verdroeg het sap 65 °C, maar geen 70 °C; bij 50 °C vond echter al enige inactivering plaats.

Sap dat bij 23 tot 25 °C bewaard werd, gaf soms na 12 uur nog een reactie op toetsplanten, in andere gevallen verloor het virus zijn activiteit reeds na 2 uur.

Door centrifugeren en precipiteren met ammoniumsulfaat is het 2 van de 5 maal gelukt *Cucumis virus 1 st. Chr.* te zuiveren.

Bladluizen, van de soort *Myzus persicae* SULZ., waren na 2 minuten zuigen

---

[1]) Volgens nomenclatuur in: K. M. SMITH, A Textbook of plant virus diseases, 1937.

op een zieke plant reeds in staat het virus op gezonde planten over te brengen.

Met behulp van de precipitatiereactie was het virus in zieke chrysanten serologisch aan te tonen. Door het optreden van spontane vlokkingen of het af en toe achterwege blijven van een reactie was het resultaat niet altijd duidelijk.

Tabakssap met *Cucumis virus 1 st. Chr.* gaf vaak een duidelijke agglutinatiereactie. Ook de gele stam No. 6 van PRICE van *Cucumis virus 1* agglutineerde met het antiserum, zodat het virus van chrysant serologisch verwant bleek te zijn met *Cucumis virus 1*.

Met de electronenmicroscoop werden min of meer ronde deeltjes gevonden, maar herhaling van het onderzoek is gewenst om zekerheid te hebben dat deze deeltjes werkelijk als het *Cucumis virus 1 st. Chr.* beschouwd kunnen worden.

Op *Nicotiana glutinosa* en *N. tabacum* beschermden *Cucumis virus 1 st. Chr.*, *Cucumis virus 1* van augurk en de gele stam No. 6 van PRICE min of meer tegen een tweede infectie met 1 van deze 3 viren. Op grond van deze bescherming (premuniteit) van de plant, de boven vermelde serologische verwantschapsreactie en de verschijnselen die dit chrysantenvirus op toetsplanten veroorzaakte, kan het besproken chrysantenvirus beschouwd worden als *Cucumis virus 1*, zij het als een afwijkende stam hiervan.

Dat het *Cucumis virus 1 st. Chr.* aansprakelijk gesteld kan worden voor het ontstaan van miskleurige en verfrommelde bloemen, zoals deze in de van nature zieke planten voorkomen, werd bewezen door sapinoculatie op enkele chrysantenvariëteiten. Daar de voor deze proef gebruikte planten reeds *virus b* bevatten, is het echter niet uitgesloten dat de waargenomen verschijnselen slechts bij de aanwezigheid van het complex *Cucumis virus 1 st. Chr.* en *virus b* optraden.

II. VIRUS B

Virus b gaf na inoculatie met sap op 7 van de 31 onderzochte plantensoorten een reactie. *Petunia hybrida nana compacta* bleek als toetsplant goed bruikbaar, mits in de te onderzoeken plant niet tevens *Cucumis virus 1 st. Chr.* aanwezig was.

De verdunningsgrens en de inactivering van het virus bij bewaring werden slechts in de zomer onderzocht en konden toen, door het geringe infectievermogen van het virus in dit jaargetijde, niet goed bepaald worden.

Bij 10 minuten verhitten vond in de wintermaanden inactivering plaats tussen 70 en 80 °C, in andere jaargetijden echter tussen 50 en 70 °C.

Zuivering van *virus b* door centrifugeren en precipiteren met ammoniumsulfaat bleek niet mogelijk, wel wanneer in plaats van ammoniumsulfaat alcohol gebruikt werd.

Met behulp van de precipitatiereactie was *virus b* aan te tonen in zieke chrysanten.

Met de electronenmicroscoop werden staafvormige deeltjes gevonden, maar herhaling van het onderzoek is gewenst om zekerheid te hebben dat deze deeltjes werkelijk als het *virus b* beschouwd kunnen worden.

III. STUNTVIRUS

Stuntvirus, met sap geïnoculeerd op 23 plantensoorten, gaf op geen enkele plant een reactie. Wel gelukte het door enting op de chrysantenvariëteit Blazing Gold (methode volgens BRIERLEY & SMITH 1951) stunt aan te tonen. Wanneer

echter naast *stuntvirus* ook *Cucumis virus 1 st. Chr.* en *virus b* in de zieke plant aanwezig waren, was deze methode niet bruikbaar.

IV. Virus c

Virus c, een onbekend virus, dat slechts in één plant aangetroffen werd, was met sap o.a. op *Petunia hybrida* over te brengen. Dit virus is nog onvoldoende onderzocht.

Lycopersicum virus 3[1]) (Tomato spotted wilt) werd nooit in chrysanten gevonden, maar kon er wel op overgebracht worden.

[1]) Volgens nomenclatuur K. M. Smith in: A Textbook of plant virus diseases, 1937.

I. INLEIDING

Het hier volgend virusonderzoek is in 1949 opgezet naar aanleiding van vragen van kwekers over bepaalde ziekteverschijnselen van chrysanten. Deze chrysanten, alle variëteiten van *Chrysanthemum indicum* L. (*Chr. morifolium* RAM.) toonden zeer duidelijk verschijnselen van virusziekten. Aanvankelijk werden ook bepaalde zwakke verwelkingsverschijnselen, die zich hoofdzakelijk uitten in necrose van de bladranden, aan een virusziekte toegeschreven, maar spoedig bleek, dat hier sprake was van een verwelkingsziekte, veroorzaakt door *Verticillium dahliae* KLEB.

Van de paar duizend variëteiten, die van *Chrysanthemum indicum* geteeld worden, zijn er ongeveer 500 in Nederland in de handel verkrijgbaar. Sinds 1945 worden jaarlijks tientallen nieuwe chrysantenvariëteiten uit Engeland en de Ver. Staten van N. Amerika geïmporteerd. Vooral de uit Engeland geïmporteerde variëteiten vertoonden vaak ernstige ziekteverschijnselen en de zendingen waren soms voor meer dan de helft door virusziekten aangetast (Royal Bronze, Crimson Crown). De ernstige toename van virusziekten in chrysanten, die na 1945 te constateren valt, zal dan ook zeker voor een groot deel veroorzaakt zijn door bovengenoemde import van ziek materiaal. De schade, die deze virusziekten in chrysanten de kwekers berokkent, is verschillend al naar mate blad of bloem of beide virusverschijnselen vertonen.

De virusverschijnselen alleen op de bladeren, waarbij dus de bloemen normaal blijven, zijn in het algemeen van weinig invloed op de handelswaarde van de snijbloem. De viruszieke bloemen echter, die miskleuring vertonen, verfrommeld en vaak ook kleiner dan normaal zijn, geven een mindere kwaliteit en zijn zelfs dikwijls voor de verkoop waardeloos.

Nauwkeurige gegevens over de financiële schade, die de virusziekten in chrysanten in Nederland teweeg brengen, zijn ons niet bekend. Het zou ons echter niet verwonderen indien deze schade vele procenten zou zijn van de gehele opbrengst, die in 1950 voor alle Nederlandse veilingen tezamen ca f 3.500.000 bedroeg (Tuinbouwgids 1952, p. 112). Ook de stekhandel in binnen- en naar buitenland, zal zeker van deze virusziekten schade ondervinden.

Door de omstandigheid dat chrysanten uitsluitend door stek vermenigvuldigd worden, kan een groot deel van de nakomelingschap ziek zijn indien men bij het stekken van een ziek gewas is uitgegaan. Daarbij komt dat zieke planten, vooral buiten de bloeitijd, dikwijls moeilijk van gezonde te onderscheiden zijn, zodat zelfs bij een oordeelkundige wijze van stekken toch nog de mogelijkheid van het overbrengen van de ziekte blijft bestaan.

Het is dan ook van veel belang, dat ook op andere wijze dan alleen uiterlijk geconstateerd kan worden of een plant ziek is of niet. Naast het inoculeren op toetsplanten zal wellicht de serologie hier mogelijkheden scheppen.

Onze doelstelling bij dit onderzoek is nu de aard van het virus (eventueel meer viren) vast te stellen o.a. door sapinoculaties en serologische methoden, om hiermede te komen tot een beter begrip van de onderzochte chrysantenziekten en zodoende ook tot een betere bestrijding daarvan.

II. LITERATUUR OVER VIRUSZIEKTEN VAN CHRYSANTEN

Alvorens het eigen onderzoek te beschrijven, willen wij beginnen met een opsomming te geven van wat in de literatuur over viren op *Chrysanthemum indicum* is gepubliceerd. Al deze viren kunnen mijns inziens worden ondergebracht tot 7 typen.

De ziekten, die oorspronkelijk als nieuw beschreven zijn, maar waarvan later het vermoeden rees, dat zij aan reeds eerder beschreven virusziekten verwant zijn, worden onder laatstgenoemde ziekten behandeld.

1. *Lycopersicum virus* 3

Lycopersicum virus 3 [1]) (Tomato Spotted Wilt). Het eerst is dit virus beschreven bij chrysanten door BALD en SAMUEL (1931) in Australië. Uitvoeriger beschrijvingen en proeven zijn uit Engeland afkomstig: AINSWORTH (1933, 1936, 1937), SMITH (1935, 1936). Ook in de Ver. Staten van Noord Amerika werd *Lycopersicum virus 3* in chrysanten aangetroffen: GARDNER & WHIPPLE (1934), JONES (1942), WEISS (1948).

BALD & SAMUEL (1931), AINSWORTH (1936, 1937) en ANON. (1949) beschrijven als ziekteverschijnsel naast geelgroene vlekken ook soms ringen en lijnen op de bladeren. Necrotische vlekken op het blad en soms op de stengel kunnen voorkomen, evenals afsterven van oudere bladeren, AINSWORTH (1933, 1937), SMITH (1935 en 1936). De aard van de verschijnselen schijnt sterk afhankelijk te zijn van de chrysantenvariëteit, terwijl ook waargenomen is dat een bepaalde kloon later in het seizoen andere ziekteverschijnselen vertoonde dan in het begin, AINSWORTH (1937).

Verwelken van de bloem wordt alleen door AINSWORTH (1933) vermeld. Streping van de bloem noemt OGILVIE (1934) als kenmerk, maar het is onzeker of in zijn planten *Lycopersicum virus 3* aanwezig was, daar dit virus er niet in kon worden aangetoond.

AINSWORTH (1936) laat zien dat sap van gezonde chrysanten een inactiverende werking uitoefent op perssap van tabak met *Lycopersicum virus 3*, en dat toevoegen van 0,5% Natriumsulfiet anhydr. oplossing bij de chrysantenbladeren waaruit sap geperst wordt, het aantonen van *Lycopersicum virus 3* op toetsplanten in belangrijke mate vergemakkelijkt.

Sapinoculatie van chrysanten met *Lycopersicum virus 3* is alleen door BALD & SAMUEL (1931) beschreven.

De literatuur over *Lycopersicum virus 3*, welke niet direct op *Chrysanthemum indicum* betrekking heeft, is hier niet gerefereerd.

2. *Cucumis virus 1* [1]) *en Aspermyvirus*

In Engeland is reeds vele malen een mozaïekziekte van chrysanten beschreven, die door AINSWORTH (1939), SELMAN (1940), SMITH (1946, 1949) en BEWLEY

[1]) Volgens nomenclatuur: K. M. SMITH, A Textbook of plant virus diseases, 1937.

& RICHARDS (1951) wordt toegeschreven aan het *Cucumis virus 1*, maar door BLENCOWE & CALDWELL (1949) aan een nieuw virus van tomaat, dat zij „*Aspermy*"*virus* (*Lycopersicum virus 7*) noemen.

Ook in de Ver. Staten is een mozaïekziekte gevonden, die wordt toegeschreven aan *Aspermy virus*, BRIERLEY & SMITH (1951 *b*).

Hoewel de mogelijkheid bestaat dat er inderdaad twee verschillende viren in het spel zijn, is het de vraag of de kruisinoculaties van BLENCOWE & CALDWELL (1949) en BRIERLEY & SMITH (1951 *b*) voldoende bewijskracht hebben om deze scheiding in twee viren te rechtvaardigen.

Wij zullen hieronder de verschillende opvattingen bespreken en beginnen met een overzicht te geven van de verschijnselen, die door bovengenoemde auteurs op chrysanten werden waargenomen, om daarna het onderzoek te vermelden dat door hen is verricht.

Ziekteverschijnselen: AINSWORTH (1939) vermeldt als enig ziekteverschijnsel bij een chrysantenvariëteit Exmouth Crimson een groen tot geel mozaïek op de bovenste bladeren. SELMAN (1940) constateert, naar waarnemingen bij minstens 6 variëteiten, dat de bladeren kleiner zijn dan normaal en dat er slechts zelden een zwak mozaïek optreedt.

Als voornaamste kenmerk noemt SELMAN verkleuring, verdraaiing en kleiner worden van de bloemen; bronskleurige bloemen vertonen gele strepen. BLENCOWE & CALDWELL (1949) en SMITH (1949) noemen behalve deze kenmerken ook nog groeiremming van de plant.

BEWLEY & RICHARDS (1951) beschrijven uitvoerig afwijkingen in de bloemen (met 2 afbeeldingen) en noemen 13 variëteiten bij welke een aantasting door het virus werd waargenomen. Van het Cheshunt Research Station zijn afbeeldingen gepubliceerd van viruszieke chrysantenbloemen waarvan de aantasting mogelijk aan ditzelfde virus te wijten is ANON. (1951 *a*).

BRIERLEY & SMITH (1951 *b*) noemen bij 4 onderzochte chrysanten de ziekteverschijnselen zwak of geheel afwezig.

Onderzoek: AINSWORTH (1939) beschouwt op grond van niet nader beschreven inoculatieproeven, een stam van *Cucumis virus 1* als oorzaak, waarbij als afwijking van de verschijnselen van het type virus een veel grotere verdraaiing van de bladeren bij *Nicotiana glutinosa* wordt aangegeven. SELMAN (1940) komt tot dezelfde conclusie als AINSWORTH, nadat hij opgemerkt heeft, dat het chrysantenvirus op tomatenzaailingen verschijnselen geeft, die enigszins afwijken van die van het typische *Cucumis virus 1*.

BLENCOWE & CALDWELL (1949) beschrijven verschijnselen op *Lycopersicum esculentum*, *Nicotiana tabacum* en *N. glutinosa*. *L. esculentum* vertoonde uitgroeiingen op de bladsteel, terwijl de draadvormige bladsymptomen (fernleaf) van *Cucumis virus 1* blijkbaar niet aanwezig waren. De verschijnselen op *N. tabacum* en *N. glutinosa* schijnen daarentegen niet duidelijk te verschillen van die welke *Cucumis virus 1* kan veroorzaken. Op grond van kruisinoculaties echter menen de schrijvers toch hier met *Aspermyvirus* van tomaat te doen te hebben.

SMITH (1949), die sterke verdraaiing en uitgroeiingen op de bladeren van *N. glutinosa* beschrijft, komt op grond van kruisinoculaties tot de conclusie dat het chrysantenvirus een stam is van *Cucumis virus 1*. Bovendien geeft hij aan dat het virus door bladluizen overgebracht kan worden. Als waardplanten van dit virus noemt SMITH (1952), *Tropaeolum*, *Phlox drummondii*, *Zinnia*, *Helichrysum*, *Cheiranthus annuus*, *Primula sinensis*, *Lactuca sativa* en *Glycine soja*.

Door BEWLEY & RICHARDS (1951) worden geen proeven beschreven.

BRIERLY & SMITH (1951 *b*) vermelden verschijnselen op *Nicotiana tabacum*, *N. glutinosa* en *Zinnia*, die doen denken aan die van *Cucumis virus 1*, maar op grond van kruisinoculaties wordt het virus toch, evenals door BLENCOWE & CALDWELL, *Aspermyvirus* van tomaat genoemd. *Myzus persicae* SULZ bracht het virus van chrysant op tabak over op de wijze van een „non persistent" virus. Het virus bleek (één proef) bij 50 °C en hoger geïnactiveerd te zijn.

BAWDEN & NIXON (1951) slaagden er niet in met het electronenmicroscoop van het *Aspermyvirus* van tomaat in ongezuiverd gecentrifugeerd sap een beeld te vormen. DE BRUYN OUBOTER, BEIJER & VAN SLOGTEREN (1951) daarentegen vonden in gezuiverd sap van tabak geïnoculeerd met een virus van chrysanten, dat hen door mij was verstrekt en dat in mijn onderzoek is aangeduid als *Cucumis virus 1 st. Chr.* ongeveer ronde deeltjes met een diameter van 75–125 mμ.

De literatuur over *Cucumis virus 1*, welke niet direct op *Chrysanthemum indicum* betrekking heeft, is hier niet gerefereerd.

3. *Stunt*

DIMOCK (1947) beschrijft onder deze naam een ziekte die in de Ver. Staten van N. Amerika in 1945 voor het eerst werd opgemerkt en tot nu toe buiten N. Amerika niet is vermeld (misschien in Duitsland gevonden, ANON. 1951 *b*). Een aantal onderzoekers, BRIERLEY (1949), KELLER (1949) en OLSON (1949) bewees dat deze ziekte door een virus veroorzaakt wordt.

De kenmerken van stunt verschillen belangrijk, al naar de chrysantenvariëteit. waarin het virus voorkomt. Het meest algemene kenmerk is groeiremming die zich in de hoogte van de plant en grootte van blad en bloem uit.

Afgezien van een steilere groei der bladeren, die soms ook bleker zijn, worden slechts bij bepaalde chrysantenvariëteiten verkleuringen op de bladeren als kenmerk opgegeven. Zo ziet men b.v. gele banden langs de nerven bij Blazing Gold, BRIERLEY & SMITH (1949), witte vlekken, „measles" bij Mistletoe, KELLER (1950).

Planten die van stunt te lijden hebben, bloeien vroeger dan gezonde planten, DIMOCK (1947), POST (1948). Bij rose-rode en bronskleurige bloemen is de bloemkleur soms bleker dan normaal.

Van de ene chrysant op de andere kan het virus worden overgebracht door enten, BRIERLEY & SMITH (1949), KELLER (1949), MIKKELSEN (1950), met sap, BRIERLEY (1950), BRIERLEY & SMITH (1949), KELLER (1949), OLSON (1949) en met behulp van Cuscuta, KELLER (1949).

Overbrenging met behulp van bladluizen gelukte niet, BRIERLEY & SMITH (1951 *a*), hoewel zij dit aanvankelijk wel beschreven (1949).

Het *stuntvirus* is ook over te brengen op *Senecio cruentus* D.C. en *Chrysanthemum parthenium* f. flosculosum (DC) Beck, maar de ziekteverschijnselen zijn daarop weinig duidelijk, BRIERLEY (1950), BRIERLEY & SMITH (1951a). Negentig plantensoorten vertoonden echter geen enkele reactie na inoculatie met *stuntvirus*, KELLER (1950).

Het meest voorkomende kenmerk van stunt, groeiremming, is een weinig betrouwbaar ziektesymptoom, daar het optreden daarvan ook andere oorzaken kan hebben. Hierop wordt gewezen door BAKER, CLARK & KIMBALL (1949) die *Deuterophoma* spp. als oorzaak van groeiremming aantoonden.

Omdat het dikwijls moeilijk is op grond van ziekteverschijnselen met zeker-

heid tot de aanwezigheid van stunt te besluiten, heeft men gezocht naar een betrouwbare toetsmethode, POST (1948), OLSON (1949), KELLER (1949, 1950), BRIERLEY (1950). BRIERLEY & SMITH (1951 *a*) beschouwen de methode van OLSON, die berust op enting op een chrysant van de variëteit Blazing Gold, als de snelste en meest betrouwbare; bevatte de ent *stuntvirus*, dan vertoont de onderstam van Blazing Gold na zes weken lichter groene banden langs de nerven. Niet onvermeld mag blijven dat KELLER (1950) daarentegen bij entingen met stunt op Blazing Gold geen ziekteverschijnselen op de bladeren waarnam, maar wel bij enting op andere chrysantenvariëteiten.

Adviezen voor het doeltreffend selecteren van chrysanten op stunt werden gegeven door POST (1948), OLSON (1949), MIKKELSEN (1950), KOHL, KOFRANEK, POST, HORTON & a. (1950).

Voor „crinkle”, een ziekte veroorzaakt door een combinatie van stunt en Blanche-mozaïek, verwijzen wij naar het „Blanche”-mozaïek.

Een virusziekte „stunt-mottle”, beschreven door WELSH (1948), onderscheidt zich van stunt door het optreden van een mozaïek dat de nerven min of meer begrenst. BRIERLEY & SMITH (1951a) menen echter dat deze ziekte dezelfde is als „stunt” of „crinkle”.

4. *„Blanche”-mozaïek*

Door KELLER (1950) is Blanche-mozaïekvirus (virus „Q”) beschreven, waarvan hij door enting aantoonde dat het in de variëteit Blanche aanwezig was, zonder op die variëteit ziekteverschijnselen te vertonen. Enting op enkele andere chrysantenvariëteiten bracht duidelijke virussymptomen teweeg. De chrysantenvariëteiten Mistletoe, KELLER (1950), en Good News, BRIERLEY & SMITH (1951*b*) vertoonden mozaïekverschijnselen en worden door de laatste auteurs als goede toetsplanten beschouwd. Vele chrysantenvariëteiten bleken verder symptoomloze carriers van dit virus.

Het virus is in Amerikaanse, maar ook in één Deense en vier Engelse chrysantenvariëteiten aangetroffen door BRIERLEY en SMITH (1951 *b*). Na sapinoculatie op *Cineraria* konden zij het virus naderhand in *Cineraria* aantonen door inoculaties op chrysant.

Het gelukte niet het virus met bladluizen over te brengen, BRIERLEY & SMITH (1951 *a* en *b*). Daar bij enten en sapinoculatie op chrysant stunt en Blanche-mozaïek niet tegen elkaar beschermden, beschouwt KELLER (1950) deze twee viren als niet verwant.

Een ziekte, „crinkle” genaamd, die bij de chrysantenvariëteit Blanche werd beschreven door BRIERLEY & SMITH (1949, 1951 *a*), wordt, op grond van entingen op chrysanten door KELLER (1950) toegeschreven aan een combinatie van *stuntvirus* en *Blanche-mozaïekvirus*.

5. *„Ivory Seagull”-mozaïek.*

BRIERLEY & SMITH (1951b) beschrijven een virus dat in de chrysantenvariëteit Ivory Seagull geen ziekteverschijnselen vertoonde, maar op enkele chrysantenvariëteiten, na sapinoculatie, wel virussymptomen opwekte. *Cineraria* en *Matricaria* Golden Ball bevatten, na sapinoculatie met sap van Ivory Seagull, het virus eveneens symptoomloos.

6. *„Big Bud"-ziekte van tomaat.*

Een virusziekte, die in New South Wales op tomaten voorkomt en met behulp van entingen en door *Thamnotettix argentata* EVANS kon worden overgebracht, is onder andere ook op chrysanten aangetroffen, HILL (1943), ANON. (1948).

7. *Aster Yellows*

Aster yellows door KUNKEL (1926) op chrysanten beschreven, komt volgens BRIERLEY & SMITH (1951) op buitenchrysanten in de U.S.A. geregeld voor en is volgens hen dezelfde ziekte als NELSON (1925) beschreef.

Groene bloemen, zwakke, bleke steil-opgroeiende zijscheuten van bloemstengels, en zwakke grondscheuten met zeer kleine blaadjes zijn drie kenmerken, waarvan er 1 of meer bij een plant kunnen voorkomen. Zieke planten van verscheidene chrysantenvariëteiten bleken meestal binnen een jaar na besmetting te sterven.

Het virus is door sapinoculatie niet over te brengen. Het wordt in de natuur door Jassidae, hoofdzakelijk *Macrosteles divisus* UHLER verspreid, zie o.a. SEVERIN (1934).

De literatuur over aster yellows die niet direct op *Chrysanthemum indicum* betrekking heeft, is hier verder niet gerefereerd.

Mededelingen voor kwekers van het hierna volgend onderzoek zijn reeds eerder gepubliceerd, NOORDAM & v. D. NES (1949), NOORDAM (1950, 1951*a*, 1951*b* en 1952 a).

III. BESCHRIJVING DER ZIEKTEVERSCHIJNSELEN EN VASTSTELLING VAN DE ZIEKTEOORZAKEN

A. Algemene inleiding

Bij het begin van het onderzoek in het najaar van 1949 gelukte het in de meeste gevallen door sapinoculatie van chrysanten met duidelijke ziekteverschijnselen, op toetsplanten als *Nicotiana tabacum* „White Burley", *N. glutinosa*, *Petunia hybr.*, typische ziekteverschijnselen te voorschijn te roepen van een virus, dat in de loop van dit onderzoek een stam bleek te zijn van *Cucumis virus 1* [1]). Ondanks herhaalde pogingen bleek het echter met andere duidelijk viruszieke chrysanten onmogelijk om op de genoemde toetsplanten ziekteverschijnselen op te wekken.

In Januari 1951 werd echter op *Petunia hybr.* als toetsplant een tot die tijd niet opgemerkte locale reactie geconstateerd, die veroorzaakt werd door een virus, dat we zullen aanduiden als *virus b*.

De methode, die bij de sapinoculaties werd gebruikt, was als volgt: chrysantenbladeren, in een mortier fijngemaakt, werden met de hand door mul (een fijn weefsel) geperst en het zo verkregen sap werd met de vinger over de bladeren der toetsplanten gewreven, die vooraf bestoven waren met carborundumpoeder 500 mesh. Enkele minuten na de sapinoculatie werden de toetsplanten besproeid of afgegoten met water.

Vermeld dient nog te worden, dat vóór het fijnmaken van de chrysantenbladeren, om een betere reactie te verkrijgen (speciaal van het *virus b*), gewoonlijk per 100 g bladeren 1 g Natriumsulfiet ($Na_2SO_3.7H_2O$) aan de bladeren werd toegevoegd (zie p. 171 e.v.).

Als toetsplanten gebruikten wij *Nicotiana tabacum* „White Burley", *N. glutinosa* en *Petunia hybrida nana compacta* gemengd en later *P. hybrida nana compacta* „Celestial" (een enkele maal ook nog andere variëteiten van *Petunia hybrida*). De toetsplanten werden gebruikt in een stadium, waarop 3–4 bladeren aanwezig waren; *Petunia* werd echter, ter verkrijging van een reactie van *virus b*, ook wel gebruikt als plant met 6–7 bladeren.

Voor de aard van de reactie van *Cucumis virus 1 st. Chr.* en *virus b* op deze toetsplanten zie men p. 140 en 168.

Door sapinoculatie op bovenvermelde wijze zijn in totaal 394 chrysanten, bebehorende tot 116 variëteiten, op de aanwezigheid van virus onderzocht, met het volgende resultaat:

183 chrysanten aangetast door *Cucumis virus 1 st. Chr.*
120 chrysanten aangetast door *virus b*.
11 chrysanten met een onbekende of twijfelachtige reactie.
53 chrysanten zonder reactie, terwijl de chrysanten wel ziekteverschijnselen vertoonden.
27 chrysanten zonder reactie, terwijl de chrysanten een gezond uiterlijk hadden.

---

[1]) Nomenclatuur volgens K. M. Smith, A Textbook of Plant Virus Diseases, 1937.

Er dient hier op gewezen te worden dat het niet uitgesloten is, dat in de 183 chrysanten met *Cucumis virus 1 st. Chr.* tevens *virus b* aanwezig was. Dit kan op *Petunia* als toetsplant slechts zelden uitgemaakt worden, doordat *Cucumis virus 1 st. Chr.* meestal de geïnoculeerde bladeren van *Petunia* tot afsterven brengt, vóórdat enige reactie van *virus b* is te verwachten. Bij in ieder geval 23 van de 183 chrysanten bleek *Cucumis virus 1 st. Chr.* en *virus b* beide in de chrysanten aanwezig te zijn.

Cucumis virus 1 st. Chr. en *virus b* zouden, op grond van de diagnose op toetsplanten, dus voor het merendeel der waargenomen ziekteverschijnselen verantwoordelijk gesteld kunnen worden.

Van de 53 planten, die wel ziekteverschijnselen vertoonden, maar waarbij geen reactie op de toetsplanten waar te nemen was, zijn er 27, die reeds vernietigd waren, voordat de methode voor het aantonen van *virus b* gevonden was. Het blijft dus onzeker of deze 27 planten door *virus b* waren aangetast. Indien we deze 27 daarom buiten beschouwing laten, blijven er van de 53 planten zonder reactie nog 26 over, die toch kennelijk virusziek waren. Naderhand werd bij 9 van deze planten, met de op p. 178 beschreven entmethode, het in N. Amerika veel voorkomende virus stunt gevonden. Niet onmogelijk zijn 10 van de dan nog resterende 17 chrysanten eveneens door stunt aangetast (dit is echter nog niet onderzocht). Deze planten waren namelijk alle uit N. Amerika geïmporteerd en vertoonden het voor stunt als meest typisch opgegeven kenmerk: groeiremming (zie p. 130).

B. Beschrijving van de ziekteverschijnselen bij een aantal chrysantenvariëteiten

De ziekteverschijnselen bij de 116 onderzochte chrysantenvariëteiten lopen zo sterk uiteen, dat een algemene beschrijving van het ziektebeeld niet te geven is. Vele chrysantenvariëteiten vertoonden ziekteverschijnselen, die karakteristiek lijken voor die bepaalde variëteit of voor een beperkt aantal variëteiten.

Wij zullen daarom hieronder slechts het ziektebeeld van 8 chrysantenvariëteiten beschrijven en bij de beschrijving eventueel vermelden, welke variëteiten een soortgelijk ziektebeeld vertonen. Van ieder van deze 8 variëteiten werden verscheidene planten (zieke en gezonde) tijdens hun groei bestudeerd, terwijl door sapinoculaties op toetsplanten werd nagegaan, welke viren in de planten aanwezig waren.

Wanneer reeds in de „gezonde" planten *virus b* werd aangetroffen, is het waarschijnlijk dat in zieke planten met *Cucumis virus 1 st. Chr.* dit *virus b* ook aanwezig was (aantoning hiervan bleek niet mogelijk, zie III A). Het kan dus zijn dat het beschreven ziektebeeld door het complex van *Cucumis virus 1 st. Chr.* en *virus b* veroorzaakt werd, terwijl *Cucumis virus 1 st. Chr.* alleen zich in de plant anders zou uiten.

1. *Crimson Crown.* Tijdens de groei zijn in het algemeen geen ziekteverschijnselen aanwezig; bij uitzondering is slechts een onduidelijk mozaïek op de bladeren waar te nemen. De lintbloemen, normaal rood, (R. d. C.*) 165^4, purpergranaatkleur) worden zeer opvallend geelgestreept of geheel geel (H.C.C.**) 2^{1-2}, kanariegeel), fig. 1 en 2.

---

*) Répertoire de Couleurs publié par la Société Française des chrysanthémistes et R. Oberthür, 1905.

**) Horticultural Colour Chart. R. F. Wilson, 1938, 1941.

In de 4 zieke planten werd *Cucumis virus 1 st. Chr.* gevonden, in de 2 normaal uitziende planten *virus b.*

2. *Deuil de Louis Barthou.* Het blad is onregelmatig bobbelig en vertoont een mozaïek van geelgroen, groen, soms een groen dat donkerder is dan normaal, en geel. Slechts hier en daar zijn scherp begrensde vlekken zichtbaar. De bloem is meest klein, terwijl de linten verfrommeld zijn, fig. 6. Het roodachtig violet van de bloem is wit gestreept.

Bij de planten met normale bloem is op het blad in geringe mate een mozaïek van geelgroen en groen te zien. In alle 5 zieke planten werd *Cucumis virus 1 st. Chr.* gevonden, in alle normaal uitziende planten *virus b.*

3. *Miss Wilcox.* Onder goede groeiomstandigheden zijn op de bladeren meestal geen ziekteverschijnselen waar te nemen. Indien deze wel aanwezig zijn, zijn zij het duidelijkst aan de 5 of 6 jongste bladeren te zien, die dan een geringe bobbeling vertonen; zij hebben een oneffen groene kleur door vaag-begrensde geelgroene vlekken. Bij het ouder worden van de bladeren verdwijnen de verschijnselen door het optreden van de donkergroene bladkleur. De normaal roodbruine (R.d.C. 331^{4-2}, terracotta) bloemen (Fig. 7) worden min of meer geel (H.C.C. 4^4, citroengeel) gestreept (Fig. 8), terwijl de het sterkst door virus aangetaste planten met geheel gele bloemen (Fig. 9) in de handel zijn als de variëteit: „Gele Miss Wilcox". De Gele Miss Wilcox blijft iets lager dan de roodbruine. Bij onderzoek werd in alle planten, in die met gestreepte bloemen (5 planten), in die van de vorm Gele Miss Wilcox (2 planten) en in die met normaal uitziende roodbruine bloemen (5 planten), *virus b* gevonden. *Cucumis virus 1 st. Chr.* bleek niet aanwezig te zijn.

Bij vegetatieve vermeerdering ontstaan uit iedere vorm weer planten met een zelfde bloemkleur; dus een rode plant levert steeds weer een vorm met rode bloemen, een gestreepte steeds weer gestreepte, de gele steeds weer gele. Uit sapinoculaties onderling (zie p. 171) werd waarschijnlijk dat de viren van de 3 verschillende kleurvormen tegen elkaar beschermen. Deze gegevens pleiten ervoor dat de planten met rode, gestreepte en gele bloemen zijn aangetast door stammen van hetzelfde virus, die virulenter zijn naarmate de aangetaste planten meer geel in de bloemen vertonen. Een aantal verschijnselen wijzen erop dat, al blijven de rode, gestreepte en gele vormen constant in de nakomelingschap, de verschillen tussen deze 3 vormen toch niet zo essentieel zijn als op het eerste gezicht lijkt:

a. De ongelijke lengte en het in de lengte samengerold zijn van de lintbloemen, kenmerken van een virusaantasting, komen ook bij de normale bloemen voor, ook al zijn deze verschijnselen bij gestreepte en gele bloemen duidelijker.

b. Hoewel steeds gesproken werd over 3 kleurvormen, verschillen de rode bloemen toch ook onderling in kleur. De ene plant heeft donkerder bloemen dan de andere. De binnenste linten van normale bloemen, vooral van die bloemen welke zich het laatst openen, kunnen geel gestreept zijn. De bloemkleur bleek sterk beïnvloed te worden door de temperatuur. Planten gekweekt bij temperaturen met maxima van ongeveer 25 °C, vertoonden bleker bloemkleur en meer geelstreping dan planten gekweekt bij temperaturen met maxima beneden 15 °C. De Gele Miss Wilcox was bij de temp. beneden 15 °C opvallend

roodbruin gestreept, terwijl 3 van de 5 normale planten bij temperaturen omstreeks 25 °C duidelijk geelgestreepte linten hadden.

c. Er is een duidelijk waarneembare afneming van bloemgrootte en hoogte der plant, naarmate de bloemen geler zijn. Toch zijn de planten met rode bloemen onderling ook ongelijk van hoogte en soms zelfs lager dan planten met gestreepte bloemen.

4. *Pink Long Island Beauty*. De enige ziekteverschijnselen die opvallen, zijn de geremde groei en de iets bleker rose bloemen. In geen der 4 onderzochte planten werd *Cucumis virus 1 st. Chr.* of *virus b* gevonden. De groeiremming en de in de jongste bladeren soms zichtbare geelgroene stipjes (Fig. 16) komen overeen met de verschijnselen welke voor stunt in de literatuur (zie p. 129) zijn vermeld.

Met de op p. 178 beschreven methode kon in 2 planten met deze ziekteverschijnselen inderdaad het *stuntvirus* worden aangetoond, terwijl 1 plant zonder verschijnselen vrij bleek te zijn van het *stuntvirus*.

5. *Prélude*. Alle planten vertonen eenzelfde bobbeling en een min of meer vlekkerig-groene kleur van het blad. Het is moeilijk te zeggen, of deze bladverschijnselen aan virusaantasting te wijten zijn, daar ze in alle planten in even sterke mate optreden.

De als normaal beschouwde bronskleurige bloem wordt bij aantasting geelgestreept of grotendeels geel. De planten met afwijkende bloem zijn meestal iets lager dan normaal.

In alle 12 planten met geelgestreepte bloemen werd *Cucumis virus 1 st. Chr.* gevonden. In 6 planten met effen bronskleurige bloem werd *virus b* gevonden, evenals in 2 planten met een geringe gele bloemstreping.

6. *Red Rolinda*. De jongste bladeren vertonen geen ziekteverschijnselen of zijn iets oneffen groen van kleur. Op oudere bladeren is min of meer duidelijk te zien dat de nerven, ook de fijnste, groen blijven, maar dat het bladmoes tussen de nerfjes geelgroen of geel is geworden. Over deze geelgroene tot gele vlekjes ligt soms een bruin waas, of er is een bruin stipje in de vlekjes te zien. (Fig. 11)

De normaal rode (R.d.C. 165^{1-2}, purpergranaatkleur) bloemkleur is bij de zieke planten bleker (R.d.C. 99^2, drakenbloedrood), en meestal geel gestreept (R.d.C. 22^2, boterbloemgeel of H.C.C. 4^1, citroengeel).

In 15 planten met bleke en geel gestreepte bloem werd *Cucumis virus 1 st. Chr.* gevonden, in 1 *virus b*. In 4 planten met normale bloemkleur werd *virus b* gevonden, in 10 kon geen virus worden aangetoond.

Een soortgelijk virus-beeld als op de bladeren van Red Rolinda werd aangetroffen, vonden wij ook bij Am. Schlager, Enchantress en Good News.

7. *Royal Bronze*. In het ernstigste geval worden zieke planten niet hoger dan de helft van de normale. De bladeren zijn dan klein en sterk bobbelig, terwijl de zijnerven van de 1e, 2e en 3e orde als richels enigszins boven het bladoppervlak uitsteken. De bobbeling gaat meestal gepaard met een meer of minder sterke asymmetrie en misvorming van het blad. De topbladeren zijn bleekgroen met geel gevlekt of geheel geel, zonder dat scherp begrensde vlekken voorkomen. Op jongere en oudere bladeren ontstaan ook wel rode vlekken. (Fig. 15)

Bij een aantal planten ziet men van bovengenoemde verschijnselen weinig. Een geringe bobbeling, iets bleker groene topbladeren en een weinig opvallend mozaïek van groen en lichtgroen zijn dan de enige ziekteverschijnselen op de bladeren.

Zijn de verschijnselen in de bladeren niet steeds opvallend, aan de bloemverschijnselen is bijna altijd met zekerheid uit te maken, of de plant ziek is of niet (Fig. 12 en 13). In het ernstigste geval ontwikkelt de plant slechts enkele knoppen, die bloemen geven met sterk verfrommelde linten, welke inplaats van roodbruin (R.d.C. 100^4, steenrood), grotendeels geel (H.C.C. 2^1, kanariegeel) zijn. In minder ernstige gevallen is de bloem slechts iets onregelmatig, maar vooral de binnenste linten en de laatste bloemen zijn dan geel gestreept.

Merkwaardig is dat naast de normale roodbruine kleur ook donkerder rode vlekken voorkomen (R.d.C. 114^4 karmozijnrood of 165^2, purpergranaatkleur).

In alle onderzochte planten met geelgestreepte bloemen, 16 in getal, werd *Cucumis virus 1 st. Chr.* gevonden, in alle onderzochte planten met normale bloem, 8 in getal, *virus b*. Verder werden nog 12 niet bloeiende planten onderzocht. Hiervan bleken slechts 2 geen van beide viren te bevatten. Deze 2 planten toonden geen ziekteverschijnselen. Van de 38 onderzochte planten waren er dus slechts 2, waarbij geen viren konden worden geconstateerd.

8. *Smiles*. In geen andere variëteit werden zulke opvallende scherp begrensde geelgroene, later gele tot witte vlekken, banden en ringen gevonden als bij Smiles (Fig. 4). Soms zijn de vlekken wat minder opvallend, wel geel, maar meer streepvormig, terwijl ze naar de bladrand in duidelijkheid en aantal toenemen (Fig. 3). Dit laatste beeld doet enigszins denken aan een voedingsziekte, bijvoorbeeld aan mangaangebrek. De bloemlinten hebben als hoofdkleur donkerrose (R.d.C. 189^{1-2}, bisschopviolet), maar zijn ten dele nog donkerder (R.d.C. 180^4, roodachtigviolet), en geelachtig (R.d.C. 12^4, amberwit) gevlekt. Bij de binnenste linten en de laatste bloemen is deze gevlektheid het duidelijkst.

In alle 15 onderzochte planten werd *Cucumis virus 1 st. Chr.* gevonden.

Bij Sweetheart werden op de bladeren ziekteverschijnselen waargenomen, die veel overeenkomst vertoonden met die welke wij bij Smiles beschreven hebben.

C. Opsomming van de onderzochte chrysantenvariëteiten, ingedeeld naar het virus dat erin werd aangetroffen

Na deze uitvoerige beschrijving van ziekteverschijnselen, volgt een overzicht van de chrysantenvariëteiten waarin *Cucumis virus 1 st. Chr.* en die waarin *virus b* werd aangetroffen, met een vermelding of, en zo ja welke afwijkingen in blad of bloem of in beide geconstateerd werden. Het zal opvallen dat een bepaalde variëteit bij virusaantasting de ene keer verschijnselen in de bladeren liet zien, een andere keer weer niet; het betreft hier altijd variëteiten bij welke de waargenomen verschijnselen vrij onduidelijk zijn, zodat de grens tussen wel- en niet verschijnselen moeilijk is vast te stellen.

1. *Cucumis virus 1 st. Chr.* werd uitsluitend aangetroffen in chrysanten bij welke steeds ziekteverschijnselen konden worden waargenomen. Het kwam echter wel vaak voor, dat van een plant de eerste bloem er gezond uitzag, maar pas de volgende bloemen duidelijk afwijkend waren. Bij de binnenste lintbloemen waren de ziekteverschijnselen ook altijd duidelijker dan bij de buitenste.

Een lijst van chrysantenvariëteiten, waarin *Cucumis virus 1 st. Chr.* werd aangetroffen volgt hier, gesplitst in 3 groepen:

a. Afwijkingen zowel in blad als bloem: August Pink, Balcombe Glory, Blanche du Poitou, Blanche Poitevine, Carefree, Corona, Crimson Crown (1 plant), Deuil de Louis Barthou, Exmouth Pink, Golden Mary Elisabeth, Little America, Mayford Pink, Miss Helen Frick, Monument, Novemberzon, Perfection, Pink Ideal, Prélude, Rayonnante, Red Mary Elisabeth, Red Matador, Red Rolinda, Rose Chocod, Royal Bronze, Ruby, Sartre, September Bronze, Smiles, Sweetheart, Tempest, Typhoon, Yellow Corona, Yellow Utopia.
b. Alleen afwijkingen in de bloem, niet in het blad: Aalsmeers Glorie, Arnhem, Crimson Crown, Duke of Kent, Elegánce, Imperial Yellow, Perfection, Prélude, Say Edgar, William Meadows.
c. Ziekteverschijnselen in de bladeren (of de bloemen van deze planten ook verschijnselen vertoonden, bleef onzeker, daar deze niet bekeken konden worden): Adama, Blazing Gold, Bronze Frieda, Bronze Ideal, Chas. E. Morris, Lady Electra, Lord Somers, Louis Germ, Mayford Orange, Mrs. L. Humphrey (Joseph), Orchid Beauty, Rogli, Smits Superlative, Source d'Or, Susy, Yellow Long Island Beauty.

2. *Virus b* werd zowel in chrysanten mét (a, b, c) als zonder (d) ziekteverschijnselen gevonden, hetgeen blijkt uit de lijst, gesplitst in 4 groepen, die hieronder volgt:

a. Afwijkingen in blad en bloem: Am. Schlager, Bronze Adonis, Good News, Little America, Mason's Red, Mayford Orange, Miss Wilcox, Mont Blanc, Orange Torch, Samaria, Shirley Ivory.
b. Alleen afwijkingen in de bloem, niet in het blad: Balcombe Perfection, Bronze Delight, Desert Song, Mason's Red, Miss Wilcox, Orchid Beauty.
c. Alleen afwijkingen in het blad, niet in de bloem: Balcombe Glory, Deuil de Louis Barthou, Friendly Rival, Lady Electra, Prélude, Red Rolinda. Bij Chas. E. Morris, Enchantress, Francis Hutchinson, Lord Somers, Précose, Source d'Or konden de bloemen niet onderzocht worden.
d. Geen ziekteverschijnselen vertoonden: Crimson Crown, Desert Song, Deuil de Louis Barthou, Duke of Kent, Elegance, Miss Wilcox, Perfection, Prélude, Royal Bronze, William Meadows. Merkwaardig is wel dat Desert Song en Miss Wilcox soms geen, soms zeer opvallende gele strepen in de bloemen vertoonden, terwijl de planten met de ongestreepte zowel als de gestreepte bloemen *virus b* bleken te bevatten. Bij de beschrijving van Miss Wilcox is hierover reeds meer gezegd (p. 134).

Bij vergelijking van de lijsten van onderzochte chrysantenvariëteiten valt op dat planten met *Cucumis virus 1 st. Chr.* ernstige ziekteverschijnselen konden vertonen, terwijl de planten van dezelfde variëteit met *virus b* er gezond uitzagen. Dit was het geval bij Crimson Crown, Deuil de Louis Barthou, Prélude en Royal Bronze, en kwam wellicht nog bij andere variëteiten voor, van welke echter te weinig planten onderzocht werden om bovenstaande conclusie te kunnen trekken.

D. Opsomming van de onderzochte chrysantenvariëteiten, ingedeeld naar de meest opvallende virusverschijnselen

Van een aantal typische ziekteverschijnselen wordt hier tenslotte aangegeven bij welke chrysantenvariëteiten deze werden opgemerkt, terwijl achter iedere variëteit tussen haakjes wordt vermeld of *Cucumis virus 1 st. Chr.* (afgekort Cu.), *virus b* (afgekort b) of *stuntvirus* (afgekort St.) werd aangetroffen, of dat de ziekteoorzaak onbekend bleef, wat met een ? is aangeduid.

1. *Groeiremming*. Groeiremming treedt meestal op bij viruszieke chrysanten, maar soms slechts in geringe mate. Zeer duidelijk was de groeiremming bij August Pink (Cu.), Clara Holford (St.), Edw. Seidewitz (Cu.), Francis Hutchinson (b), Friendly Rival (b en ?), Indianapolis White (St.), Indianapolis Yellow (St.), Miss Helen Frick (?), Mrs. L. Humphrey (Cu.), Novemberzon (Cu.) Orchid Beauty (b), Pink Long Island Beauty (St.), Roselind (?), Royal Bronze (Cu.), Rose Frieda (b), Smits Superlative (Cu.), Snowfall (Cu.), Snowwhite (b), Tempest (Cu.), The Titan (?), White America (b), White Valencia (?), Yellow Nevada (?).

Het valt op, dat een groot aantal van de onderzochte planten geen *Cucumis virus 1 st. Chr.* of *virus b* bleken te bevatten. Groeiremming alleen is een onbetrouwbaar kenmerk, doordat ook voedingsfouten en b.v. vaatziekten een remming van de groei kunnen veroorzaken. Het is evenwel waarschijnlijk dat in een aantal van deze nog onvoldoende onderzochte gevallen de groeiremming door *stuntvirus* is veroorzaakt (zie p. 177).

2. *Afwijkingen in bladkleur*

a. Bepaalde chrysanten kunnen een zeer duidelijk *mozaïek* van normale en lichtgroene vlekken vertonen: Carefree (Cu.), Mayford Orange (Cu.), Royal Bronze (Cu.), Samaria (b), Sartre (Cu.), Smiles (Cu.), Yellow Cleone (Cu.), Yellow Utopia (Cu.).

b. Een *kringvormige tekening* op de bladeren komt min of meer duidelijk bij vele chrysanten voor. Duidelijke kringen werden waargenomen bij Dorothy Jackson (b), Enchantress (b), Exmouth Pink (Cu., b), Mont Blanc (b ?), Perfection (Cu.), Samaria (b), Shirley Ivory (b), Smiles (Cu., fig. 4), Source d'Or (b, soms + Cu., fig. 10), Sweetheart (Cu.), Tempest (Cu.).

Minder duidelijk waren ook kringen te zien bij Aanwinst (b ?), Carefree (Cu.), Red Rolinda (Cu.) en Say Edgar (Cu.).

c. *Necrose* in de vorm van stipjes komt voor bij Am. Schlager (b), Enchantress (b), Good News (b), Novemberzon (Cu.), Red Rolinda (Cu., fig. 11).

d. Necrotische kringen vertoonden Exmouth Pink (Cu., b) en Mayford Pink (Cu., b, fig. 14). Een geringe nerfnecrose werd alleen bij Mayford Orange (Cu., b) waargenomen.

3. *Bladmisvorming*. Sterke bladmisvorming kwam voor bij Mayford Orange (Cu., b), Pink Ideal (Cu.) en Royal Bronze (Cu.). Zwakke bladmisvorming, die zich soms alleen uitte in een asymmetrie van het blad, kwam bij meer chrysanten voor, o.a. bij Mrs. L. Humphrey (Cu.) en Yellow Utopia (Cu.).

4. *Afwijkingen in bloemkleur*.

a. Bij chrysanten met rode, bronskleurige en bruine bloemen worden de bloemen van viruszieke planten geheel of ten dele geel: Aalsmeers Glorie (Cu.),

Aanwinst (b?), Amber Bright (Cu., b), Am. Schlager (b), Arnhem (Cu.), Balcombe Perfection (b?), Bronze Adonis (b), Bronze Delight (b), Bronze Ideal (Cu.), Carefree (Cu.), Corona (Cu.), Crimson Crown (Cu., fig. 2), Desert Song (b), Hurricane (b?), Mason's Red (b), Mayford Triumph (?), Miss Wilcox (b, fig. 8 en 9), Prélude (Cu.), Red Mary Elisabeth (Cu., b), Red Matador (Cu.), Red Rolinda (Cu.), Royal Bronze (Cu., fig. 12), Sartre (Cu.), September Bronze (Cu.), Tempest (Cu.), Typhoon (Cu.), William Meadows (Cu., b).

b. Bij chrysanten met paarsrode, lichtrode en rose bloemen zijn de bloemen na aantasting wit gevlekt of geheel wit: August Pink (Cu.), Deuil de Louis Barthou (Cu.), Elegance (Cu.), Enchantress (b), Exmouth Pink (Cu.), Madame J. Gieuilles (?), Miss Helen Frick (Cu.), Pink Ideal (Cu.), Rose Chocod (Cu.), Ruby (Cu., fig. 18 en 19), Say Edgar (Cu.). Soms loopt de kleur echter terug naar bleekgeel: Mayford Pink (Cu.), Samaria (b en ?), Smiles (Cu.), Sweetheart (Cu.).

c. Bij chrysanten met witte bloemen zijn geen, met gele bloemen zelden verkleuringen te zien. Gele bloemen krijgen soms lichter gele of bijna witte vlekken: Monument (Cu. en ?).

5. *Afwijkingen in vorm en lengte van de lintbloemen.* Bij viruszieke planten zijn de linten dikwijls ongelijk van lengte, bobbelig en verfrommeld. Vertonen de chrysanten geen afwijkingen in bloemkleur, dan zijn de verschijnselen aan de linten (naast groeiremming en afwijkingen in het blad) het beste symptoom van virusziekte.

Deze afwijking in de linten werd waargenomen bij: Balcombe Glory (Cu.), Blanche du Poitou (Cu.), Blanche Poitevine (Cu.), Deuil de Louis Barthou (Cu., fig. 6), Duke of Kent (Cu.), Golden Mary Elisabeth (Cu.), Good News (Cu.) Imperial Yellow (Cu.), Little America (Cu.), Gele Miss Wilcox (b, fig. 9), Mont Blanc (b), Perfection (Cu.), Rayonnante (Cu.), Shirley Ivory (b), Snowfall, (Cu.), Source d'Or (Cu.), Sweetheart (Cu.), Tempest (Cu.) en Typhoon (Cu.).

Stellen wij tenslotte de vraag of het mogelijk is, op grond van de ziekteverschijnselen bij een chrysant, te zeggen door welk virus de plant is aangetast, dan is op deze vraag geen algemeen antwoord te geven, wat uit een paar voorbeelden zal blijken.

De bloemstreping, die in de literatuur (Selman, 1940; Bewley & Richards, 1951) aan een stam van *Cucumis virus 1* wordt toegeschreven, blijkt in ons onderzoek niet tot dit virus beperkt te zijn; necrose in de literatuur opgegeven als een soms optredend kenmerk van *Lycopersicum virus 3* (zie literatuuroverzicht p. 127) vonden wij ook bij chrysanten, in welke *Cucumis virus 1 st. Chr.* of *virus b* aanwezig bleek te zijn.

Op grond van het feit, dat vele chrysantenvariëteiten, bij aanwezigheid van een bepaald virus (*Cucumis virus 1 st. Chr.* of *virus b*), een voor iedere variëteit karakteristiek ziektebeeld vertoonden, lijkt het ons toch dikwijls wel mogelijk aan de hand van de verschijnselen bij de plant tot aanwezigheid van hetzij *Cucumis virus 1 st. Chr.* hetzij *virus b* te besluiten.

Uit de literatuur blijkt dit voor enkele chrysantenvariëteiten met *stunt virus* ook het geval te zijn; diagnosemethoden voor stunt berusten hier dan ook op. (Zie literatuuroverzicht, p. 129 e.v.).

IV. CUCUMIS VIRUS 1 VAN CHRYSANT

A. Sapinoculatie met cucumis virus 1 st. chr. op toetsplanten

Nadat gebleken was dat met sap van bepaalde chrysanten onder andere op tabak mozaïekverschijnselen teweeggebracht konden worden, is nagegaan of dit chrysantenvirus ook op andere plantensoorten een reactie gaf. Aan de ene kant met het doel om meer plantensoorten te vinden die geschikt als toetsplant gebruikt konden worden, aan de andere kant om met de reactie op deze andere plantensoorten te kunnen komen tot identificatie van de viren.

Jonge exemplaren van in totaal 35 plantensoorten werden geïnoculeerd met sap van tabak, die met chrysantensap was geïnoculeerd en ziekteverschijnselen vertoonde van *Cucumis virus 1 st. Chr.* De sapinoculaties werden verricht op dezelfde wijze als beschreven is op p. 132. Wij laten hier een beschrijving volgen van de ziektesymptomen, die door *Cucumis virus 1 st. Chr.* bij 17 van de 35 geinoculeerde plantensoorten werden veroorzaakt, terwijl tenslotte een opsomming volgt van de plantensoorten, bij welke geen of een onduidelijke reactie werd waargenomen. De met een * aangeduide toetsplanten, nl. *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana glutinosa* en *Petunia hybrida nana compacta* Celestial, bleken tenslotte het meest geschikt voor de aantoning van *Cucumis virus 1 st. Chr.* (zie p. 144).

Antirrhinum maximum album

Vier van de 5 planten vertoonden op de geïnoculeerde bladeren na 3 weken 1 of 2 ringen om een centrale stip. De ringen werden gevormd door lichtbruine stipjes.

In de niet-geïnoculeerde *Antirrhinum*-bladeren werd bij sapinoculatie van deze op tabak geen *Cucumis virus 1 st. Chr.* gevonden; het virus heeft zich dus in zijn uitbreiding, blijkbaar tot de geïnoculeerde bladeren beperkt.

Callistephus sinensis, Dwerg Allerheiligen

Na 4 weken vertoonden alle 5 geïnoculeerde planten op de niet-geïnoculeerde topbladeren een mozaïek van licht en normaal groen, dus spreidsymptomen. De bloemkleur was bleker lila, de linten waren sterker verfrommeld dan normaal. Sapinoculatie van de topbladeren op tabak gaf weer *Cucumis virus 1 st. Chr.*-reactie.

Chrysanthemum indicum, zie p. 44.

Cucumis sativus

Van de in totaal 75 geïnoculeerde planten, reageerden slechts 15 planten met een zwakke locale reactie op de zaadlobben, bestaande uit gele vlekjes van 1 mm diam., gepaard gaande met enige bobbeling. Merkwaardigerwijs waren deze 15 planten alle op dezelfde datum geïnoculeerd, hoewel niet alle met sap van dezelfde plant. Inoculatie met sap van niet-geïnoculeerde bladeren gaf nooit reactie op tabak.

Datura stramonium

Op de geïnoculeerde bladeren ontstonden bij 11 van 42 planten na 12 tot 14 dagen vaagbegrensde geelgroene vlekken.

Na 2 weken werden spreidsymptomen zichtbaar, donkerder opgebolde plekken. Dit verschijnsel trad steeds weer op in later uitgroeiende bladeren en ging dikwijls gepaard met bladversmalling, tot draadvorming toe. Vaak was de bloemkroon gespleten in slippen, die evenals de meeldraden verwrongen uitgroeiden.

Helianthus annuus

Bij 1 van 4 geïnoculeerde planten werd mozaïek als spreidsymptoom waargenomen. Inoculatie van deze plant op *Nicotiana glutinosa* gaf een reactie van *Cucumis virus 1 st. Chr.*

Helichrysum bracteatum monstrosum fl. pl., gemengd

Slechts zelden was bij de 20 reagerende planten, (40 waren geïnoculeerd), op de geïnoculeerde bladeren een reactie zichtbaar, als een vlekkerige vergeling na 3 tot 4 weken. Spreidsymptomen verschenen na 4 tot 8 weken, als een mozaïek van scherp begrensde, geelgroene, gele, normaal groene en soms donkerder groene vlekken. De bladeren waren bovendien soms bobbelig of min of meer misvormd en verwrongen. Ook de bloemen waren vlekkerig. Inoculatie met sap gaf op tabak en *Petunia* een reactie van *Cucumis virus 1 st. Chr.*

* *Nicotiana glutinosa*

Op grond van talloze proeven wordt hier de reactie beschreven van *Cucumis virus 1 st. Chr.* op *N. glutinosa.*

De geïnoculeerde bladeren sterven na 2 weken af, terwijl vooral bij inoculatie van zeer jonge plantjes een necrose van de stengel en een afsterven van de gehele plant volgen kan.

Op de niet-geïnoculeerde, nieuw uitgroeiende topbladeren, is na 1 week een lichte begrenzing van de nerven waar te nemen; nog enkele dagen later is een mozaïek van licht- en normaalgroen te zien of het gehele blad is bleekgroen met enkele donkerder groene, opgebolde vlekken. Bij de planten, die in leven blijven, groeit de top langzaam door en vormt na 10, soms reeds na 5 weken bladeren met een sterk gereduceerde, vooral versmalde bladschijf. De bladschijfhelften kunnen zeer ongelijk zijn, met een onregelmatige rand. De reductie van de bladschijf kan zo ver gaan, dat alleen de hoofdnerf nog aanwezig is. De bladschijfreductie gelijkt sprekend op die welke bij *Petunia* door *Cucumis virus 1 st. Chr.* wordt veroorzaakt (verg. fig. 26 met 24). De bloemen zijn enigszins bobbelig of gespleten. Inoculatie op toetsplanten gaf weer een reactie van *Cucumis virus 1 st. Chr.*

Nicotiana paniculata

De meeste van 35 op dezelfde datum geïnoculeerde planten, met sap afkomstig van verschillende chrysantenvariëteiten, vertoonden op de geïnoculeerde bladeren min of meer duidelijk gele of bruine necrotische vlekken, na 2 tot 4 weken.

Tegelijkertijd was op de niet geïnoculeerde bladeren een lichte begrenzing van de nerven te zien, die gevolgd werd door een vrij onduidelijk mozaïek.

Nicotiana rustica

De meeste van 35 op dezelfde datum geïnoculeerde planten met sap afkomstig van verschillende chrysantenvariëteiten, vertoonden op de niet-geïnoculeerde bladeren na 3 weken een onduidelijk mozaïek, en soms ringen. Na 4 weken gingen de geïnoculeerde bladeren afsterven, waarna vervolgens necrose van de stengel kon optreden.

Nicotiana silvestris

In twee inoculatie-series, ieder van een andere datum (in totaal 50 planten) waren op de geïnoculeerde bladeren, na bijna 3 weken, geelgroene vlekjes te zien van ongeveer 2 mm diam., die enkele dagen later een iets bruinere tint kregen. Een enkele maal werd een necrotische ring zichtbaar van 2 mm diam., terwijl hierbinnen soms een necrotisch stipje te zien was, of weer een necrotisch ringetje. Deze necrotische ringen namen 4 tot 6 weken na de inoculatie nog steeds in aantal toe, werden duidelijker en waren dikwijls concentrisch.

Op de niet-geïnoculeerde bladeren werden soms, na ongeveer 4 weken, geelgroene ronde vlekken zichtbaar.

* *Nicotiana tabacum* „White Burley”

Naar ziektesymptomen, waargenomen in talloze proeven, worden hier de verschijnselen bij tabak beschreven.

Op de geïnoculeerde bladeren is, na ongeveer 1 week, een geringe bobbeling te zien. Bij het naderhand afsterven van deze bladeren, worden soms gele, min of meer ringvormige vlekken zichtbaar. Op het eerste uitgroeiende, niet geïnoculeerde blad, is na 7 tot 10 dagen aan de bladvoet een geringe bobbeling te zien, die gepaard gaat met een lichter groene kleur langs de nerven. Het volgende uitgroeiende blad vertoont over het gehele oppervlak een zwakke bobbeling, de bladranden zijn naar beneden toe omgebogen, de nerven zijn lichtgroen begrensd en hier en daar zijn geelgroene vlekken zichtbaar. Bij het ouder worden spreidt de bladschijf zich meer uit en valt het op, dat de bladrand onregelmatig is, wat het blad min of meer asymmetrisch maakt. Zeer karakteristiek zijn ronde, geelgroene, vaagbegrensde vlekken of ringen, ongeveer 1 cm in diam., die zich in een klein aantal op het blad vertonen, dat verder een mozaïek laat zien van donkerder, normaal, en lichter groen en groengeel (Fig. 22).

Een enkele maal werd een enigszins afwijkende reactie waargenomen. Zo trad in een bepaald geval sterke groeiremming op, gepaard gaande met sterke misvorming en necrose der bladeren. Ook zagen wij bij inoculatie met sap van enkele chrysanten dat een deel der tabaksplanten een sterke bladversmalling liet zien, met omkrullen van de bladranden naar boven toe, en uitgroeiingen op de onderzijde der bladeren. Tenslotte zij nog vermeld dat soms op één of twee der eerste bladeren met spreidsymptomen een doolhofachtig patroon kan voorkomen, bestaande uit groene en groengele concentrische ringen en zigzaglijnen.

Inoculatie op tabak en andere toetsplanten gaf de reactie van *Cucumis virus 1 st. Chr.*

** Petunia hybrida nana compacta*

Ook deze beschrijving der ziektesymptomen berust op waarnemingen uit talloze proeven. Op de geïnoculeerde bladeren ontstaan, na 6 tot 10 dagen, grijze vlekken van 1–1½ mm diam., die soms echter een diameter van 2–3 mm krijgen en dan ringvormig zijn met een groen centrum. Langzamerhand sterven deze bladeren af, hetgeen in uitzonderingsgevallen stengelnecrose ten gevolge heeft. Op de nieuw uitgroeiende bladeren is na 7 tot 10 dagen een lichte begrenzing van de nerven te zien en later een mozaïek van groene, opgebolde vlekken op een verder lichtgroen of licht vaalgroen gekleurd blad. Na 5 weken treedt reductie van de bladschijf op, zodat soms alleen de hoofdnerf over blijft (Fig. 24). Halverwege de bladschijf springt de hoofdnerf soms, als een draadvormig aanhangsel uit het blad. Het blad kan ook ten dele trompetvormig zijn.

De bloemkroon is dikwijls in een aantal slippen gespleten, die trechtervormig kunnen zijn (Fig. 25). Vaak komen uitgroeiingen op de bloemkroon voor.

Een moeilijkheid bij de beoordeling van ziekteverschijnselen bij *Petunia* wordt veroorzaakt door de grote verschillen die de van nature reeds min of meer bobbelige of vlekkerig groene bladeren vertonen. In een proef, waarbij de reactie op *Petunia* „gemengd" vergeleken werd met die op enkele kleurvormen uit het mengsel – nl. op Sneeuwbal, Celestial en Raadsheer –, gaf Celestial nog de duidelijkste symptomen.

Inoculatie op *Petunia* en andere toetsplanten gaf weer een reactie van *Cucumis virus 1 st. Chr.*

Primula obconica

Op de niet-geïnoculeerde bladeren werd na 3 tot 4 weken een mozaïek zichtbaar van vaag begrensde normaal groene en geelgroene vlekken, gepaard gaande met een sterkere bobbeling van het blad dan normaal. De bloemen waren klein en wit gevlekt.

Inoculatie op toetsplanten gaf weer een reactie van *Cucumis virus 1 st. Chr.*

Senecio cruentus (syn. Cineraria cruenta) grandiflora

In 3 inoculatie-series met in totaal 20 planten, vertoonde slechts één plant op de geïnoculeerde bladeren, na 2 maanden bij het vergelen, een groene zigzagtekening die de nerven volgde. Inoculatie op tabak gaf een reactie van *Cucumis virus 1 st. Chr.*

Solanum Lycopersicum

Een maand na inoculatie waren de 5 geïnoculeerde planten achter in groei en werd een mozaïek in de topbladeren zichtbaar van licht en normaal groen. De blaadjes waren ook bobbelig en iets misvormd, maar bladversmalling werd niet waargenomen. Inoculatie op toetsplanten gaf *Cucumis virus 1 st. Chr.*-reactie.

Tropaeolum majus nanum „Empress of India"

Bij alle 4 planten van één serie vertoonden de geïnoculeerde bladeren na 12 dagen necrotische kringen van ½–1 mm diam. Naderhand werden bruine concentrische ringen zichtbaar, terwijl het tussenliggende weefsel, met gele en oranje kleuren ging afsterven en ook nerfnecrose optrad. Maanden later ver-

schenen op de niet-geïnoculeerde bladeren paarsbruine, grillig gevormde lijnen en kringen met tussenliggend geel of ten dele nog groen weefsel.

Inoculatie van bladeren met spreidsymptomen gaf op tabak *Cucumis virus 1 st. Chr.*-reactie.

Zinnia elegans dahliiflora

Bij 16 van 25 planten ontstond op de niet-geïnoculeerde bladeren na 3 tot 5 weken een mozaïek van licht en normaal groen. De bloemlinten van een oranje bloem vertoonden rode en enkele gele streepvormige vlekken.

Inoculatie op tabak gaf *Cucumis virus 1 st. Chr.*-reactie.

Een enkele inoculatie op 5 planten van *Adonis aestivalis*, *Ageratum mexicanum*, *Calendula officinalis*, *Calliopsis lanceolata*, *Chrysanthemum carinatum*, *C. leucanthemum*, *C. segetum*, *Dianthus barbatus*, *Doronicum caucasicum*, *Gaillardia grandiflora*, *Gerbera jamesonii*, *Iberis coronata*, *Matricaria eximia*, *Papaver nudicaule*, *Phaseolus vulgaris*, *Solanum capsicastrum* en *Tagetes patula* gaf geen of een zeer twijfelachtige reactie. Wij volstaan dan ook met deze vermelding.

Wat de geschiktheid betreft om als toetsplant van *Cucumis virus 1* te dienen is het duidelijk (p. 141 e.v.) dat *Nicotiana tabacum*, *N. glutinosa* en *Petunia hybrida* hiervoor het meest in aanmerking komen. *N. tabacum* geeft een zeer duidelijke, snelle reactie, maar heeft het bezwaar dat het ziektebeeld met dat van tabaksmozaïek verward kan worden. Het gebruik van *N. glutinosa als* toetsplant naast *N. tabacum* is daarom vaak gewenst. *Petunia hybr. nana compacta* „Celestial" is als toetsplant zeer geschikt, maar geeft door zijn onregelmatige bladvorm en bladkleur moeilijkheden bij het herkennen van de symptomen van *Cucumis virus 1*, vooral als deze zeer zwak optreden.

Bij vergelijking van de verschijnselen op toetsplanten, die hier beschreven zijn, met wat uit de literatuur hierover bekend is, valt direct de grote overeenkomst op met het ziektebeeld dat door AINSWORTH en SMITH bij *Nicotiana glutinosa* is beschreven, AINSWORTH (1939), SMITH (1949; 1951, p. 16–17). Op *Cucumis sativus* werden door SMITH, evenals door mij, geen of hoogstens zwakke locale symptomen gevonden, SMITH (1949; 1951, p. 238).

Ook de verschijnselen van *Aspermy virus* op *Nicotiana glutinosa* en het wegblijven hiervan op *Cucumis sativus*, schijnen met die van het *Cucumis virus 1* van chrysant overeen te komen, BLENCOWE & CALDWELL (1946, 1949), BRIERLEY & SMITH (1951 b).

Alle toetsplanten, waarop het chrysantenvirus een reactie gaf, blijken (behalve misschien *Senecio cruentus*) ook in de literatuur vermeld te zijn als toetsplant of waardplant van *Cucumis virus 1*.

Bij enkele door mij onderzochte planten, zijn de ziekteverschijnselen echter enigszins verschillend van die welke in de literatuur zijn beschreven.

Behalve de reeds bovengenoemde afwijkende reactie van het chrysantenvirus op *Nicotiana glutinosa*, schijnt ook de door mij van *Petunia hybr.* beschreven bladversmalling (p. 143) van andere stammen van *Cucumis virus 1* niet bekend te zijn.

Sterk afwijkend is de reactie van het chrysantenvirus op *Cucumis sativus;* van lelies is echter eveneens een stam van *Cucumis virus 1* beschreven die, evenals

het chrysantenvirus, hoogstens een dergelijke locale reactie geeft, AINSWORTH (1938).

Enkele planten, nl. *Calendula*, *Phaseolus*, *Solanum capsicastrum*, en *Tagetes* gaven met het chrysantenvirus geen reactie, maar zijn in de literatuur wel als waardplanten van *Cucumis virus 1* vermeld; mogelijk dat bij herhaling der proeven wel verschijnselen zouden optreden.

Op grond van de op toetsplanten waargenomen verschijnselen, veroorzaakt door het chrysantenvirus, lijkt het ons, ondanks het feit dat de verschijnselen op enkele toetsplanten vrij sterk afwijken, toch wel waarschijnlijk dat dit virus een stam is van het *Cucumis virus 1*.

Het is daarom ook, mede door de ervaringen bij het premuniteitsonderzoek (p. 162), en de serologie (p. 156), dat het virus van het begin af aan reeds als een stam van het *Cucumis virus 1* is betiteld.

B. SAPINOCULATIES OP CHRYSANTHEMUM INDICUM

Terwijl nu de resultaten op de toetsplanten, de aanwezigheid (al dan niet tezamen) van 2 duidelijk verschillend reagerende viren in de zieke chrysanten aannemelijk maken, is vervolgens getracht met het perssap van de geïnoculeerde toetsplanten, kunstmatig gezonde chrysanten te infecteren en zodoende op deze de verschijnselen op te wekken, die bij de van nature zieke planten aanwezig waren.

Met toetsplanten, die verschijnselen van *Cucumis virus 1 st. Chr.* vertoonden, werden daarom sapinoculaties uitgevoerd op:

1. Zaailingen van *Chrysanthemum indicum;*
2. Jonge planten van bestaande variëteiten van *C. indicum*, die door stekken waren vermenigvuldigd.

Het voordeel van het gebruik van zaailingen is, dat deze waarschijnlijk virusvrij zijn, daar hierin nooit een virus kon worden aangetoond. Een groot nadeel is de grote variabiliteit in groei, bladvorm, bloemvorm, -kleur en -grootte.

Het voordeel van het gebruik van bestaande variëteiten is de gelijkvormigheid der planten, waardoor de geïnoculeerde planten met onbehandelde planten beter vergeleken kunnen worden. Een nadeel is, dat men, ook na voorafgaande inoculatie op toetsplanten, nooit geheel zeker is dat deze planten virusvrij zijn.

a. Sapinoculatie op zaailingen met Cucumis virus 1 st. Chr.

Opgepotte zaailingen van *Chrysanthemum indicum* „dubbele gemengd" werden 18-5-1951 en nog eens 15-6-1951 geïnoculeerd met sap van tabak met verschijnselen van *Cucumis virus 1 st. Chr.* (Zie methode, beschreven op p. 132). Niet geïnoculeerde zaailingen dienden als contrôle. De planten werden in pot tot de bloei verder gekweekt, in een kas die tegen insecten door zeer fijn bronsgaas afgesloten was. Geregeld werd met nicotine gerookt, wat echter niet geheel afdoende bleek te zijn. Daarom werd later het effectiever werkende blauwzuurgas gebruikt.

Gedurende de gehele groeiperiode werden geen viruszieklteverschijnselen op de bladeren waargenomen.

Tijdens de bloei vertoonden 10 van de 24 met *Cucumis virus 1 st. Chr.* geïnoculeerde planten, bloemen met onregelmatige, gedraaide, vaak gestreepte

bloemlinten. Op tabak en *Petunia* gaven 5 van deze 10, en dus geen der andere 14 planten een reactie van *Cucumis virus 1 st. Chr.*

In de contrôlegroep waren 3 planten van de 24, die onregelmatigheden in de bloem vertoonden; één van deze bleek door *Cucumis virus 1 st. Chr.* aangetast te zijn, een andere plant gaf een twijfelachtige reactie van *Cucumis virus 1 st. Chr.* Het feit dat de bladluis-bestrijding in het begin niet afdoende was, kan het optreden van *Cucumis virus 1 st. Chr.* in de contrôlegroep verklaren.

Hoewel een scherpe conclusie uit deze proef niet mogelijk is, geeft deze proef wel enige aanwijzingen dat zowel een onregelmatige vorm van de bloem als een streping van de bloemkleur door *Cucumis virus 1 st. Chr.* veroorzaakt zouden kunnen worden.

b. Sapinoculatie op chrysantenvariëteiten met Cucumis virus 1 st. Chr.

In deze proef werd stek gebruikt van moerplanten, waarvan vooraf door sapinoculatie op toetsplanten was komen vast te staan, dat zij vrij waren van *Cucumis virus 1 st. Chr.* Bij dit toetsen der moerplanten, bleken echter alle planten van de 4 varietëiten die voor deze proef waren uitgekozen, op *Petunia* de reactie van *virus b* te geven. Ondanks dit bezwaar zijn de proeven met dit materiaal uitgevoerd, daar op korte termijn geen mogelijkheid bestond tot het vinden van geheel virusvrije planten.

Telkens 10 jonge chrysanten van de 4 variëteiten werden 7 Juni 1951 geïnoculeerd met sap van tabak met verschijnselen van *Cucumis virus 1 st. Chr.* Ter vergelijking dienden van iedere variëteit 5 onbehandelde planten en 5 planten die van nature reeds door *Cucumis virus st. Chr.* waren aangetast. Alle planten zijn in een kas, die met bronsgaas voor insecten was afgesloten en die aanvankelijk geregeld met nicotine werd gerookt en later met blauwzuurgas werd gegast, verder gekweekt. Door het al te sterk terugsnijden van de planten tijdens de groei, uitgevoerd om de planten niet al te hoog te laten worden (in verband met de beschikbare ruimte) zijn er enkele dood gegaan, welke bij de resultaten zullen worden vermeld.

Voor een uitvoerige beschrijving van de ziekteverschijnselen bij deze variëteiten wordt verwezen naar p. 134 e.v..

Sapinoculatie op de variëteit Deuil de Louis Barthou

Noch in blad, noch in bloem (eind November) is enig verschil opgetreden tussen de contrôlegroep en de groep geïnoculeerd met *Cucumis virus 1 st. Chr.* In de van nature aangetaste planten waren 4 planten (één was dood) duidelijk ziek: de linten der bloemen waren verfrommeld en witgestreept. Bij sapinoculatie op tabak en *Petunia* vertoonden 3 van deze 4 planten *Cucumis virus 1 st. Chr.*-reactie, terwijl geen der andere planten uit de proef een virusreactie gegeven heeft op deze toetsplanten. Bij Deuil de Louis Barthou is het dus niet gelukt om planten door sapinoculatie ziek te maken.

Sapinoculatie op de variëteit Prélude

Tijdens de bloei in eind October, was de kleur der bloemen (ten gevolge van de vrij hoge kastemperatuur) over het geheel lichtbruin. In tegenstelling tot de bloemen van de onbehandelde groep, die effen van kleur waren, vertoonden 5 van de 10 met *Cucumis virus 1 st. Chr.* geïnoculeerde planten, bloemen die op

dezelfde wijze geelgestreept waren, als die in de van nature zieke groep. Twee van de 10 planten waren door hierboven reeds vermelde oorzaak vóór de bloei dood gegaan. Bij sapinoculatie op toetsplanten, bleken ook inderdaad alleen de 5 planten met gestreepte bloemen en de van nature zieke planten een reactie van *Cucumis virus 1 st. Chr.* te geven.

Bij Prélude is het dus gelukt, door inoculatie van sap afkomstig van een toetsplant met *Cucumis virus 1 st. Chr.*-verschijnselen, planten ziek te maken, zo dat deze planten dezelfde bloemafwijkingen vertoonden als de planten waarin van nature *Cucumis virus 1 st. Chr.* werd aangetroffen.

Sapinoculatie op de variëteit Miss Wilcox

Tussen de 5 onbehandelde planten en de 10 met *Cucumis virus 1 st. Chr.* geïnoculeerde planten was noch in blad, noch in bloem (eind November) enig verschil te constateren. Een groep van 5 van nature door *Cucumis virus 1 st. Chr.* aangetaste planten ontbrak, daar deze nog nooit aangetroffen waren (In van nature zieke planten werd altijd slechts *virus b* gevonden).

Ook bij sapinoculatie op toetsplanten, bleek geen enkele plant de reactie van *Cucumis virus 1 st. Chr.* te voorschijn te roepen.

Het is dus niet gelukt om bij Miss Wilcox, door inoculatie met sap van een toetsplant met *Cucumis virus 1 st. Chr.* ziekteverschijnselen op te wekken.

Sapinoculatie op de variëteit Royal Bronze

Van de 10 met *Cucumis virus 1 st. Chr.* geïnoculeerde planten, waarvan er 2 (door te sterk terugsnijden) vóór de bloei dood waren, vertoonden 5 planten, eind October, dezelfde sterke gele en rode streping als de 5 van nature zieke planten (fig. 12).

De geïnoculeerde planten vertoonden ook verfrommelde linten op dezelfde wijze als van nature zieke planten. Alle andere planten, ook van de onbehandelde groep, waren normaal effen roodbruin van kleur (Fig. 13). Na sapinoculatie op toetsplanten bleken ook inderdaad alle planten met gestreepte bloemen een reactie van *Cucumis virus 1 st. Chr.* te geven, terwijl geen van de andere planten dit deed.

Nog duidelijker dan bij Prélude bleek hier dat met *Cucumis virus 1 st. Chr.* geïnoculeerde planten dezelfde ziekteverschijnselen vertoonden als planten waarin van nature *Cucumis virus 1 st. Chr.* werd aangetroffen. (Fig. 23)

C. Eigenschappen van cucumis virus 1 st. chr. in perssap

a. Verdunningsgrens

Zowel bij de zuivering van het virus, als bij de bepaling van de inactiveringstemperatuur en van de tijd gedurende welke het virus in perssap zijn infectievermogen behoudt, is het van belang, dat men enig inzicht heeft in de mate van besmettelijkheid van het virus.

Men vraagt zich dus af, bij welke verdunning het perssap van een viruszieke plant nog in staat is toetsplanten ziek te maken. De sterkste verdunning waarbij nog infectie mogelijk is, noemt men de *verdunningsgrens*. Uit de literatuur blijkt, dat deze grens vrij constant is voor een bepaald virus, in een bepaalde plantensoort, wanneer men tenminste werkt in een seizoen, dat gunstig is voor de ontwikkeling van de betreffende virusziekte. Deze betrekkelijke constantheid maakt

dat de verdunningsgrens soms een bruikbaar determinatiekenmerk der viren kan zijn.

In 5 proeven werd onderzocht tot hoever *Cucumis virus 1 st. Chr.*-houdend perssap verdund kan worden, dat het op toetsplanten nog een reactie geeft.

Proef *1* (8-12-'50)

Tabaksbladeren van planten, die 1½ maand van tevoren met *Cucumis virus 1 st. Chr.* waren geïnoculeerd, werden fijn gemaakt in een mortier en uitgeknepen door mul. Het zo verkregen sap werd verdund met gedestilleerd water. Iedere verdunning werd geïnoculeerd op 10 planten van *Nicotiana tabacum* „White Burley", die van tevoren met carborundumpoeder waren bestoven.

Uit deze proef, waarvan het resultaat in de bovenste regel van tabel 1 is samengevat, blijkt, dat na inoculatie met sap, dat zelfs tot 1 : 1.000.000 was verdund, nog één plant ziekteverschijnselen vertoonde.

TABEL 1. Aantal planten met positieve reactie na inoculatie met sap, in verschillende verdunningen, van Nicotiana tabacum besmet met Cucumis-virus 1 st. Chr.
Number of plants with positive reaction after inoculation with sap, in different dilutions, from Nicotiana tabacum infected with Cucumis virus 1 st. Chr.

Proef *Exper.*	Datum *Date*	Toetsplant *Indicator plant*	Aantal *Number*	Verdunning van perssap *Dilution of sap*						
				Onverdund *Undiluted*	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
1	8-12-'50	Nicotiana tabacum	10	10	10	10	9	6	2	1
2	10-11-'51	Nicotiana tabacum	5	5	5	5	5	5	5	–
3	21- 4-'52	Nicotiana tabacum	5	5	4	2	1	1	0	–
4	3- 5-'52	Nicotiana tabacum	5	5	5	5	3	0	0	–
5	4- 1-'51	Petunia hybrida	10	10	10	10	2	0	0	0

De proeven *2* (10-11-'51), *3* (21-4-'52) en *4* (3-5-'52), zijn uitgevoerd met sap van tabak met *Cucumis virus 1 st. Chr.* op de boven beschreven wijze, met dit verschil, dat 5 in plaats van 10 toetsplanten werden geïnoculeerd. In proef *3* waren de tabaksbladeren met het virus vóór het uitpersen bevroren. De resultaten van deze proeven zijn weergegeven in tabel 1.

Overzien we het resultaat van deze 4 proeven, dan blijkt het perssap bij een verdunning van 10^{-3} altijd nog min of meer een reactie op toetsplanten te geven. Bij *Nicotiana tabacum* als toetsplant blijkt de verdunningsgrens in 2 van de 4 proeven een veel lagere waarde te bezitten, n.l. beneden 10^{-5}. In de andere 2 proeven ligt de grens omstreeks 10^{-3} tot 10^{-4}.

Wij wijzen er op, dat de eerste 2 proeven in de winter zijn genomen, proef *3* en *4* daarentegen in April en Mei. Het is zeer waarschijnlijk dat seizoensfactoren op het resultaat van deze proeven hun invloed deden gelden. Terwijl verschillende auteurs deze invloed van het jaargetijde reeds constateerden (BAWDEN 1950 p. 29 e.v.) is ook mij herhaaldelijk gebleken dat het infectievermogen van het virus in de voorjaars- en zomermaanden sterk is gedaald, waardoor het werken met het virus in deze maanden zeer wordt bemoeilijkt.

Of hier de virus-concentratie van de planten, waaruit het sap geperst wordt, dan wel de vatbaarheid der toetsplanten met het jaargetijde verandert, is nog een open vraag.

Proef 5 (4-1-'51)

Uit tabaksbladeren van planten, die $1\frac{1}{2}$ maand tevoren met *Cucumis virus 1 st. Chr.* waren geïnoculeerd, werd, zoals in proef *1* is beschreven, sap geperst. Het verdunde sap werd geïnoculeerd op telkens 10 planten van *Petunia hybr. nana compacta* „Celestial", die van tevoren met carborundumpoeder waren bestoven.

Eveneens op de boven beschreven wijze werd perssap van een chrysant, die *Cucumis virus 1 st. Chr.* bevatte, op *Petunia*-planten geïnoculeerd.

De resultaten van het eerste deel van deze proef zijn samengevat in tabel 1, terwijl die van de gehele proef nog eens in tabel 2 zijn weergegeven.

TABEL 2. Reactie van Petunia op Cucumis virus 1 st. Chr. in verschillende verdunningen, bepaald aan de hand van het aantal locale vlekken (kol. 3) en van spreidsymptomen (kol. 4)
Reaction of sap containing Cucumis virus 1 st. Chr. in different dilutions, determined from the number of local lesions (col. 3) and of systemic infection (col. 4) on Petunia

Herkomst Cucumis virus 1 st. Chr. *Source Cucumis virus 1 st. Chr.*	Verdunning [1]) *Dilution* [1])	Aantal vlekken op Petunia-toetsplant No. *Number of lesions on Petunia-indicator plant No.*											Aantal planten met spreidsymptomen (van 10) *Number of plants (out of 10), systemic infection*
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1–10	
Nicotiana tabacum	onverdund *undiluted*	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞[2])	10
„ „	10^{-1}	25	14	7	18	5	30	5	0	7	7	118	10
„ „	10^{-2}	6	5	2	1	9	1	5	4	2	2	37	10
„ „	10^{-3}	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	2	2
Chrysanthemum indicum	onverdund *undiluted*	0	5	0	15	7	5	3	1	8	7	51	10
„ „	10^{-1}	0	0	3	2	2	4	1	4	5	7	28	9
„ „	10^{-3}	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	5
„ „	10^{-2}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

[1]) Verdunningen van 10^{-4}, 10^{-5} en 10^{-6} waren zonder reactie en zijn in de tabel weggelaten. *Dilutions 10^{-4}, 10^{-5} and 10^{-6} gave no reaction and are omitted in table 2.*

[2]) ∞: vlekken op de bladeren zo talrijk, dat deze niet afzonderlijk te tellen waren. *∞: lesions too numerous, to be countable.*

Zie voor de reactie van *Cucumis virus 1 st. Chr.* op *Petunia* p. 143.

In tabel 2 is het aantal vlekken, dat iedere plant op de geïnoculeerde bladeren vertoonde, aangegeven in kolom 3, terwijl in kolom 4 is aangegeven het aantal planten dat spreidsymptomen vertoonde.

In deze proef blijkt *Cucumis virus 1 st. Chr.* bij geen sterkere verdunning dan van 10^{-3} verschijnselen op de toetsplanten te geven.

Het chrysantensap laat een minder sterke verdunning toe dan het tabakssap:

1. Met tabakssap vertonen meer *Petunia*-planten spreidsymptomen dan met chrysantensap.
2. Het aantal vlekken op de bladeren na inoculatie met tabakssap bij verdunningen van 10^{-2} en 10^{-3} komt ongeveer overeen met dat van chrysantensap bij verdunningen van respectievelijk 10^{-1} en 10^{-2}.

In proef *5* blijkt perssap met *Cucumis virus 1 st. Chr.* minder sterk verdund

te kunnen worden dan in proef *1* en *2*, die in hetzelfde jaargetijde werden genomen. Mogelijk is *Petunia* een minder vatbare toetsplant dan *Nicotiana tabacum*, wat wij bij talrijke inoculaties reeds meenden op te merken; een proef waarbij deze twee toetsplanten onder geheel gelijke proefomstandigheden met elkaar worden vergeleken, ontbreekt echter.

b. Inactiveringstemperatuur

Proef *6* (10-2-'51). Tabaksbladeren, die ongeveer $1\frac{1}{2}$ maand na inoculatie duidelijk de verschijnselen van *Cucumis virus 1 st. Chr.* vertoonden, werden fijn gemaakt in een mortier, door mul geperst en verdeeld over 9 buisjes die tot aan de inoculatie op de toetsplanten in ijs werden bewaard. De buisjes werden in een waterbad gedurende 10 minuten verhit, respectievelijk tot 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 en 90 °C, waarna ze weer onmiddellijk in ijs gezet werden. Vervolgens werden de sapmonsters geïnoculeerd op telkens 5 planten *Nicotiana tabacum* „White Burley". Uit het resultaat van deze proef, die samengevat is in tabel 3, blijkt dat dit sap een verhitting tot 65 °C verdraagt, tot 70 °C echter niet meer.

TABEL 3. Cucumis virus 1 st. Chr. Inactiveringstemperatuur.
Thermal inactivation point.

	Temperatuur in °C				*Temperature in °C*				
	Onverhit *Untreated*	55	60	65	70	75	80	85	90
Aantal planten (van 5) met symptomen . . . . *Number of Nicotiana tabacum-plants with symptoms (out of 5)*	5	5	5	4	0	0	0	0	0

In een temperatuurstraject van 5 graden, tussen 65 en 70 °C, blijkt het virus dus zijn infectievermogen volledig verloren te hebben.

In de volgende proef (*7*) met *Petunia*, blijkt dat de inactivering door verhitten over een groter temperatuurstraject plaats vindt. Hier was het mogelijk, door het aantal grijze vlekken op de geïnoculeerde bladeren te tellen, de sterkte der aantasting te controleren.

Proef *7* (3-1-'51). Deze proef werd op dezelfde wijze uitgevoerd als de vorige. Het sap werd verhit tot 45, 50, 55, 60 en 65 °C, maar de sapinoculatie werd uitgevoerd op telkens 5 planten van *Petunia hybr. nana compacta* „Celestial" en op telkens 5 *Nicotiana glutinosa*-planten.

Van *N. glutinosa* werden alle planten ziek, behalve 4 van de 5 planten die geïnoculeerd waren met sap, verhit tot 65 °C.

Bij *Petunia* vertoonden alle geïnoculeerde planten naderhand *Cucumis virus 1 st. Chr.*-verschijnselen. Uit het aantal vlekken, die na 5 dagen op de geïnoculeerde bladeren geteld werden, (zie tabel 4) blijkt echter dat boven 50 °C reeds in belangrijke mate een afneming van de activiteit van het virus plaats vond.

In proef *8* (23-11-'49), waarbij het sap in de tijd die verliep tussen uitpersen en inoculeren (minstens 1 uur) niet in ijs was bewaard, bleek de inactiveringstemperatuur lager te liggen, en wel voor *Petunia* bij 40 °C en voor *N. glutinosa* bij 50 °C. Het sap is hier waarschijnlijk door het niet in ijs bewaren, nog enigszins verder geïnactiveerd (zie volgend hoofdstuk).

TABEL 4. Inactiveringstemperatuur van Cucumis virus 1 st. Chr, bepaald aan de hand van locale reactie op Petunia
Thermal inactivation point of Cucumis virus 1 st. Chr, determined from the number of local lesions on Petunia

	Aantal vlekken per plant No. *Number of lesions per plant No.*					
	1	2	3	4	5	Totaal 1–5 *Total 1–5*
Onverhit (*Untreated*)	40	100	75	50	100	365
45 °C	30	100	40	100	100	370
50 °C	100	50	50	40	35	275
55 °C	11	1	10	6	24	52
60 °C	5	10	3	23	3	44
65 °C	1	7	0	8	5	21

Samenvattend kan gezegd worden dat het perssap van *Cucumis virus 1 st. Chr.*-bevattende planten van *Nicotiana tabacum* „White Burley", bij 65 °C nog actief was, bij 70 °C echter niet meer. Bij *Nicotiana glutinosa* lag de inactiveringsgrens ook omstreeks 65 °C. Bij *Petunia* was door tellen van het aantal vlekken een activiteitsafneming waar te nemen tussen 50 tot 65 °C.

Hoewel het resultaat in deze proeven vrij eenvormig is, zou het m.i. toch niet juist zijn een algemene conclusie ten opzichte van de inactiveringstemperatuur te trekken, aangezien verschillende factoren, als die van het jaargetijde, de toestand der geïnfecteerde plant, de toestand en leeftijd der plant, waarvan het sap genomen is, en de concentratie van het virus in het sap, een rol bij de bepaling kunnen spelen.

Een nauwkeurige bepaling van de inactiveringstemperatuur zou een uitgebreid onderzoek eisen, waarbij gestreefd zal moeten worden naar een constantheid in bovengenoemde factoren.

c. Inactivering tijdens het bewaren

Proef *9* (25-10-'50). Sap geperst uit bladeren van tabak, die na sapinoculatie verschijnselen van *Cucumis virus 1 st. Chr.* vertoonden, werd bewaard bij een temperatuur van 15 à 16°, met een schommeling van korte duur tussen 13 en 19 °C. Dit sap werd respectievelijk na 0, 4, 8, 28 en 48 uur geïnoculeerd op telkens 5 planten van *Nicotiana tabacum* „White Burley" en *N. glutinosa*.

Alle planten van *N. tabacum*, die na 0 en 4 uur waren geïnoculeerd, toonden ziekteverschijnselen; geen enkele plant echter van de andere groepen. Van *N. glutinosa* werden alleen 4 planten ziek, die na 0 uur, dus direct na het uitpersen waren geïnoculeerd.

In een volgende proef *10* (31-3-'52), waarbij telkens 5 planten van *Nicotiana glutinosa* en 5 planten van *N. tabacum* na 0, 2, 4, 8, 24 en 48 uur waren geïnoculeerd met sap van tabak met *Cucumis virus 1 st. Chr*, (bewaard bij 25°C) zijn alleen 3 planten van *N. glutinosa* en 4 van *N. tabacum* ziek geworden, die na 0 uur waren geïnoculeerd.

In een derde proef *11* (3-5-'52) werd het perssap bewaard bij 23-25°C en na respectievelijk 0, 2, 4, 6, 8 en 12 uur geïnoculeerd op telkens 5 planten van *N. tabacum* „White Burley". Alle planten vertoonden naderhand *Cucumis virus 1 st. Chr.*-verschijnselen, behalve 1 plant na bewaren van het sap gedurende 8 uur, en 4 planten na 12 uur bewaren.

Wanneer we het resultaat van deze proeven overzien, blijkt het dat het virus in het perssap vrij snel zijn activiteit verliest; gezegd kan worden dat de langste bewaartijd (bij 23 tot 25°C), waarbij er nog van activiteit van het virus sprake was, 12 uur geweest is, terwijl in de andere proeven deze bewaartijd veel korter was en inlag tussen 4 en 0 uur.

De resultaten zijn hier allerminst eenvormig. Ook hier is een meer uitgebreid onderzoek zeker gewenst in de geest zoals onder de inactivering bij verhitten (p. 151) reeds is aangeduid, om inzicht te krijgen in de factoren, die invloed uitoefenen op de inactivering tijdens het bewaren.

Nabespreking

Over de eigenschappen in perssap van *Cucumis virus 1* bij chrysanten wordt in de literatuur niets vermeld, wel echter over die van het *Aspermy virus*, (zie p. 129), BLENCOWE & CALDWELL (1949), BRIERLEY & SMITH (1951).

De in de literatuur vermelde eigenschappen van perssap van *Cucumis virus 1* in andere gewassen komen vrij goed overeen met die welke in dit onderzoek van het chrysantenvirus zijn beschreven:

1. Vele onderzoekers vonden een verdunningsgrens beneden of tot 1:10.000, BHARGAVA (1951), CHAMBERLAIN (1939), DOOLITTLE (1920), HARTER (1938). POUND & WALKER (1948) vonden echter een verdunningsgrens van 1:100.000. De verdunningsgrens kan dus vrij sterk variëren zoals ook voor het chrysantenvirus gevonden werd (p. 148).
2. De inactivering bij verhitten vindt plaats tussen 50 en 70°C. NIENOW (1948) vond volledige inactivering bij 65-70°C, maar reeds een begin bij 50°C, zoals ook in dit onderzoek (p. 151) bij *Petunia* werd vastgesteld.
3. De tijd dat *Cucumis virus 1* in perssap bewaard kan worden, varieert in de literatuuropgaven meestal van 2 tot 10 dagen, o.a. CHAMBERLAIN (1939), HARTER (1938), FULTON (1950). Slechts KÖHLER (1935) en NIENOW (1948) vermelden inactivering in korter tijd dan 24 uur, wat meer met mijn ervaringen met het chrysantenvirus overeenkomt.

D. ZUIVERING VAN CUCUMIS VIRUS 1 VAN CHRYSANT

Om met behulp van de electronenmicroscoop inzicht te krijgen in de vorm der virusdeeltjes, is het van belang over zo zuiver mogelijk virus te kunnen beschikken.

De bij het volgende zuiveringsonderzoek gebezigde methode, ontleend aan die welke te Rothamsted (Engeland) in gebruik is, is beschreven door ALGERA, THUNG & V. D. WANT (1947). De methode is hieronder in het kort weergegeven, terwijl de details, die nog al eens wisselden, bij de afzonderlijke proeven zijn vermeld.

Bladeren van tabak met *Cucumis virus 1 st. Chr.* werden bevroren, daarna fijngemaakt in een mortier, en door kaasdoek of mul geperst, waarna het perssap, om overtollige celbestanddelen kwijt te raken, werd gecentrifugeerd. Nadat de bovenstaande vloeistof was afgegoten, werd hieraan per 100 cc 25 g $(NH_4)_2SO_4$ in kristalvorm toegevoegd en na 2 uur staan werd wederom kort gecentrifugeerd. Het precipitaat, dat nu het virus behoorde te bevatten, werd weer op-

genomen in een kleine hoeveelheid water, in cellophaan gebonden en gedialyseerd in stromend water gedurende 12 uur.

Om zekerheid te hebben dat het virus in het verloop van de zuivering nog aanwezig was, werden van tijd tot tijd inoculaties op toetsplanten verricht.

In proef *12* (5-9-'50) bleek, bij sapinoculatie op toetsplanten, het virus na 80 minuten centrifugeren bij 13.000 toeren per minuut reeds uit de bovenstaande vloeistof verdwenen te zijn.

In een volgende proef *13* (10-1-'51) werd daarom, door verschillende tijden te centrifugeren, getracht na te gaan wanneer het virus uit de bovenstaande vloeistof in het residu terecht zou komen. De bovenstaande vloeistof bleek hier echter, anders dan bij proef *12*, na 10, 20, 40 en 80 minuten centrifugeren bij 13.000 toeren per min. nog steeds het virus te bevatten. In welke concentratie het virus telkens nog aanwezig was, is niet onderzocht.

In proef *14* (26-7-'51), waarbij ruw sap van tabak met *Cucumis virus 1 st. Chr.* in een vloeistoflaag van ½ cm gedurende 75 minuten bij 3000 toeren per min. werd gecentrifugeerd, bleek zuivering met bovenvermelde methode mogelijk. Zowel de gezuiverde vloeistof als het ruwe sap, gaven, ook in een verdunning van 1:10, 1:100 en 1:1000, op *Nicotiana tabacum* als toetsplant een reactie van *Cucumis virus 1 st. Chr.*

Proef *15* (10-11-'51), een herhaling van proef *14*, liet zien dat de gezuiverde vloeistof en het ruwe sap op telkens 5 planten *N. tabacum* als toetsplant, bij een verdunning tot zelfs 1:100.000, op alle planten nog verschijnselen gaven van *Cucumis virus 1 st. Chr.*

In proef *16* (21-4-'52) en *17* (3-5-'52), die geheel op dezelfde wijze werden uitgevoerd als proef *14* en *15*, gaf de ongedialyseerde vloeistof, verdund tot 1:10 en 1:100, geen reactie op toetsplanten, hoewel het ongezuiverde perssap, in een verdunning van resp. 1:10.000 en 1:1000, nog wel een reactie gaf.

Het merkwaardige feit doet zich hier voor, dat het twee maal gelukte *Cucumis virus 1 st. Chr.* te zuiveren (proef *14* en *15*), terwijl driemaal de zuivering mislukte (proef *12*, *16* en *17*), hoewel bij proef *16* en *17* dezelfde methode gebruikt werd als bij proef *14* en *15*.

Bij 2 mislukte zuiveringen bleek het virus reeds na het eerste centrifugeren uit de vloeistof verdwenen te zijn. Het is mogelijk, dat het virus door een sterke binding aan celbestanddelen, als b.v. de chloroplasten, met deze bestanddelen in het residu terecht is gekomen. Ook zou het virus in een zó sterk geaggregeerde toestand in het sap aanwezig geweest kunnen zijn, dat het daardoor alleen al met de celbestanddelen afgecentrifugeerd werd. Van een geaggregeerd zijn van het virus geven de electronenfoto's duidelijk blijk, (zie fig. 27 en 28).

De vraag blijft bestaan waarom de zuivering in proef *14* en *15* dan wel gelukte. Indien de aggregatie van het virus of de binding aan celbestanddelen niet altijd even sterk is, welke factoren zouden dan hiervoor aansprakelijk kunnen zijn?

Sill, Burger, Stahman & Walker (1952) constateerden in hun onderzoek met *Cucumis virus 1* eveneens een verdwijnen van het virus in het residu bij lage centrifugesnelheden, waaruit ook zij tot een sterke aggregatie of een sterke gebondenheid aan celbestanddelen van het *Cucumis virus 1* besloten.

E. Gegevens van cucumis virus 1 st. chr. verkregen met electronenmicroscopie

De electronenmicroscoop kan ons de vorm en grootte van virusdeeltjes leren kennen en zo belangrijke gegevens verschaffen voor de identificatie van viren. Om deze reden is het dan ook, dat pogingen zijn gedaan om met behulp van de electronenmicroscoop een beeld te krijgen van het *Cucumis virus 1 st. Chr.* Hierbij werd hulp verleend door Dr A. C. van Dorsten [1]), van het Wetenschappelijk Laboratorium der Philips Fabrieken te Eindhoven, L. H. Bretschneider [1]) van het Zoölogisch Laboratorium te Utrecht, en Mej. Dr C. van der Scheer [1]) van het Laboratorium voor Natuur- en Weerkunde te Wageningen.

De preparaten die met de electronenmicroscoop werden onderzocht, waren op de volgende wijze gemaakt: Met een entnaald met oogje werd een druppel van de te onderzoeken vloeistof op het membraan van de preparaathouder gebracht. De druppel werd na enkele minuten grotendeels afgezogen met filtreerpapier. Na drogen aan de lucht gedurende een dag, zijn de preparaten ter contrastvorming met een laagje palladium of goud bedekt, volgens de techniek van het „shadow-casten". Vervolgens werden de preparaten met de electronenmicroscoop onderzocht.

De virushoudende vloeistof, die op het membraan van de preparaathouder was aangebracht, werd door toepassing van één van de drie volgende methoden verkregen:

1. Sap uit zieke bladeren geperst, werd gedeeltelijk gezuiverd op een wijze die beschreven is op p. 152. Na het zuiveren werd de vloeistof verdund tot 1:10, 1:100 en 1:1000, en in deze toestand overgebracht op de preparaathouders.
2. Sap uit zieke bladeren geperst, werd, al of niet na voorafgaand bevriezen, gecentrifugeerd tot een heldere vloeistof, verdund tot 1:10, 1:100, en 1:1000 en in deze toestand op de preparaathouders overgebracht.
3. Afgesneden takken of bladeren van zieke planten werden met stengel of bladsteel bevestigd in een doorboorde kurk, die in de hals van een afzuig-erlenmeyer werd vastgebonden. Op de afzuig-erlenmeyer werd de waterleiding aangesloten. Onder invloed van de druk van het water werden de bladeren stijf en wanneer de rand van een blad werd afgesneden, kwamen uit de nerfjes heldere vloeistofdruppels te voorschijn. Deze druppels werden op de preparaathouders gebracht. De methode is reeds beschreven en toegepast door Johnson (o.a. 1951) en in een enigszins andere vorm door Thung (1948).
   Van 5 van de 25 preparaten, die volgens de 3 beschreven methoden van besmet sap waren gemaakt, zijn in totaal 6 foto's vervaardigd. Zowel in sap van zieke tabak als in sap van zieke chrysanten werden steeds enigszins bolvormige deeltjes van uiteenlopende grootte gevonden. De kleinste deeltjes hadden een afmeting van 20–25 mμ. Daarnaast echter waren er deeltjes zichtbaar met een doorsnee van 25–75 mμ (Fig. 27), en meer onregelmatig gevormde, afgeplatte deeltjes van 100–150 mμ (Fig. 28). De meeste deeltjes, maar vooral die van 100–150 mμ, maakten de indruk aggregaten te zijn van kleinere. Hoewel de deeltjes van de bovengenoemde 3 groepen van afme-

[1]) Dr A. C. van Dorsten, den Heer L. H. Bretschneider, mej. Dr C. v. d. Scheer en de leiding van de betreffende laboratoria wordt dank betuigd voor de hulp die de schrijver mocht ontvangen.

tingen het meest opvallend voorkwamen, waren in de preparaten toch alle maten van 20–150 mμ waar te nemen.

Ook in de preparaten van sap van gezonde planten werden altijd wel min of meer bolvormige deeltjes aangetroffen, maar steeds in zeer gering aantal en nooit met grote afmetingen. De grootste diameter die wij vonden was 75 mμ.

Hoewel men verwachten zou dat in de gedeeltelijk gezuiverde preparaten (21-4-'52), die met de eerste methode waren gemaakt, de virusdeeltjes opvallender en, in verhouding, in groter aantal zichtbaar zouden zijn dan in de preparaten die volgens de 2 andere methoden waren vervaardigd, bleek dit toch niet het geval te zijn. In een aantal preparaten waren weinig, in andere in het geheel geen deeltjes te vinden, welke als het virus beschouwd zouden kunnen worden. Inoculatie op toetsplanten van het gezuiverde sap, dat voor het maken der preparaten werd gebruikt, bewees, door het wegblijven van een reactie, dat het virus in geen of slechts zeer geringe hoeveelheid in het sap aanwezig moet zijn geweest. Misschien is ook hier, zoals bij de volgende methode het geval bleek te zijn, het virus bij het centrifugeren voor een groot deel uit de vloeistof verdwenen.

In de preparaten die volgens de tweede methode van gecentrifugeerd sap werden gemaakt (25-1-'52 en 6-8-'52), waren naast veel verontreinigingen, de reeds genoemde bolvormige deeltjes in ongeveer dezelfde hoeveelheid zichtbaar als in de preparaten vervaardigd volgens de eerste methode. Bij gelijktijdige inoculatie (6-8-'52) op toetsplanten van het ongecentrifugeerde perssap en van de bovenstaande vloeistof na centrifugeren, beide in verdunningen van 1:10, 1:100, 1:1000 en 1:10.000, bleek het ongecentrifugeerde perssap bij een verdunning van 1:1000 nog een reactie te geven, terwijl de gecentrifugeerde vloeistof slechts in een verdunning van 1:10 nog verschijnselen gaf. Het ligt voor de hand aan te nemen dat het virus bij het centrifugeren grotendeels uit de bovenstaande vloeistof is verdwenen en in het residu is terecht gekomen.

Veel minder verontreinigingen werden aangetroffen in de preparaten die volgens methode 3 waren vervaardigd (6-8-'52). Ook hier waren bolvormige deeltjes aanwezig, zij het gering in aantal. Na inoculatie van enkele druppels vocht, zoals die voor het maken der preparaten werden gebruikt, ontstonden op toetsplanten geen ziekteverschijnselen. Het virus kan dan ook in de preparaten hoogstens in zeer geringe hoeveelheid aanwezig geweest zijn.

Soortgelijke bolvormige deeltjes, met een diameter van 75–125 mμ, vonden ook DE BRUYN OUBOTER, BEIJER & VAN SLOGTEREN (1951) in sap van tabaksplanten geïnoculeerd met het *Cucumis virus 1 st. Chr.*, dat door mij aan hen werd verstrekt.

Ook SILL, BURGER, STAHMANN & WALKER (1952) vonden voor het *Cucumis virus 1* ronde deeltjes, met een diameter van ongeveer 35 mμ.

BAWDEN & NIXON (1951) daarentegen, menen dat het beeld van *Cucumis virus 1* staafvormig is. Zij publiceerden hun waarneming echter onder enige reserve. JOHNSON (1951) slaagde er niet in deeltjes van *Cucumis virus 1* te vinden.

Het is zeer wel mogelijk dat de min of meer bolvormige deeltjes, die in bijna alle preparaten werden aangetroffen het *Cucumis virus 1 st. Chr.* voorstellen. De sterke aggregatie, die in de electronenfoto's valt waar te nemen, doet vermoeden dat de oorzaak van het verdwijnen van het virus bij het centrifugeren, in dit

aggregeren is gelegen (zie p. 153 en 155). Voortgezet onderzoek is gewenst om van een en ander meer zekerheid te verkrijgen.

F. Serologie van cucumis virus 1 st. chr.

Daar het aantonen van de aanwezigheid van *Cucumis virus 1 st. Chr.* in chrysantenplanten door middel van sapinoculaties op toetsplanten een tijdrovende en veel kasruimte vergende methode is, zou het van groot belang zijn indien het virus serologisch aangetoond kon worden.

Bovendien zou, indien een antiserum bereid kon worden, behalve door het premuniteitsonderzoek, ook serologisch een eventuele verwantschap met andere, reeds bekende stammen van het *Cucumis virus 1* aangetoond kunnen worden.

Een beschrijving van het verrichte serologisch onderzoek met de resultaten volgt hieronder.

Van der Want te Wageningen heeft, door inspuiting van konijnen met *Cucumis virus 1 st. Chr.*-houdend plantensap, een antiserum bereid op een wijze als door hem en Beemster in 1951 werd beschreven: Beemster & van der Want (1951). Voor de inspuitingen werd gebruik gemaakt van tabaksplanten (*Nicotiana tabacum* „White Burley"), die ongeveer 1½ maand te voren waren geïnoculeerd met sap dat *Cucumis virus 1 st. Chr.* bevatte.

Met dit antiserum nu is getracht het *Cucumis virus 1 st. Chr.* in zieke planten aan te tonen, met behulp van de 2 bekende reacties: de „precipitatie"- en de „agglutinatie"-reactie. De micromethoden, die hierbij werden toegepast en hieronder worden beschreven, komen overeen met die welke werden gevolgd door Booij, de Bruyn Ouboter, Cremer & van Slogteren (1944):

Alvorens de reactie uit te voeren, werd ter verzadiging, d.w.z. om het serum van ongewenste antilichamen te ontdoen, ruw perssap van gezonde tabaksbladeren gemengd met het serum. Na 2 uur bij 37°C te hebben gestaan, werd het mengsel tot de volgende dag bij 0°C bewaard en vervolgens afgecentrifugeerd, waarna het gereed was om gebruikt te worden voor de reacties.

Een druppel antiserum werd op een dekglaasje samengebracht met een druppel sap. Het dekglaasje werd omgekeerd en bevestigd op een met kranenvet ingesmeerd ringetje, dat op een objectglas was gekit. Het geheel werd bij 37°C gezet en in de hangende druppel kon de reactie plaats vinden.

Bij de precipitatiereactie was het sap van te voren gecentrifugeerd, terwijl bij de agglutinatiereactie het ruwe ongecentrifugeerde perssap werd gebruikt.

Na 10 tot 60 minuten werden de druppels bekeken met behulp van een prepareermicroscoop onder een 30-malige vergroting en een donkerveld-belichting met een sterke lichtbundel onder een hoek van 90°.

Verdere details in de methodiek worden bij de bespreking van de resultaten vermeld.

Resultaten met de precipitatie-reactie

Zowel met sap van tabak als van chrysant met *Cucumis virus 1 st. Chr.* werd een duidelijke precipitatiereactie verkregen.

Wij laten een beschrijving van een proef met chrysantensap volgen:

Proef *18* (29-6-'50).

Een deel antiserum en 1 deel normaalserum (dus van een niet ingespoten konijn),

waren een dag vóór het uitvoeren van de reactie vermengd met 1, 3 en 7 delen gezond tabakssap en behandeld zoals hierboven beschreven.

De volgende dag werden de te onderzoeken chrysantenbladeren gedurende 2 uur bevroren bij –10°C, in een mortier fijngemaakt, en door mul gezeefd, waarna het verkregen sap 60 minuten werd gecentrifugeerd bij 3000 toeren per minuut. Hierna werd antiserum en normaal serum met het chrysantensap samengebracht volgens het onderstaande schema (tabel 5). Na een half uur staan bij 37°C, werd het resultaat beoordeeld, zie tabel 5.

TABEL 5. Positieve (+) of negatieve (–) reactie van verzadigd antiserum van Cucumis virus 1 st. Chr. met chrysantensap (met en zonder Cucumis virus 1 st. Chr.), in verschillende verdunningen met aq.dest.
Positive (+) or negative (–) reaction of saturated antiserum of Cucumis virus 1 st. Chr. with sap of chrysanthemum infected with Cucumis virus 1 st. Chr· and with sap of healthy plants, in different dilutions with aq. dest.

	Verzadigd met gezond tabakssap *Saturated with healthy sap of tobacco*	Gezond *Healthy* On-verd. *Undil.*	Gezond *Healthy* 1 + 1	Gezond *Healthy* 1 + 3	Gezond *Healthy* 1 + 7	Ziek *Diseased* On-verd. *Undil.*	Ziek *Diseased* 1 + 1	Ziek *Diseased* 1 + 3	Ziek *Diseased* 1 + 7	NaCl 0.9% *NaCl 0.9%*
NaCl 0,9% *NaCl 0,9%*	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
Normaal serum 1dl. *Normal serum 1p.*	1dl. *1p.*	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	3dl. *3p.*	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	7dl. *7p.*	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Anti serum 1dl. *Anti serum 1p.*	1dl. *1p.*	–	–	–	–	+	+	+	–	–
	3dl. *3p.*	–	–	–	–	++	++	++	+	–
	7dl. *7p.*	–	–	–	–	++	++	++	+	–

Het blijkt dus dat verzadigd antiserum met ziek chrysantensap een duidelijke precipitatie kan geven, zelfs nog (maar dan in mindere mate), wanneer het sap 8 × verdund is. In de contrôle's (normaalserum en NaCl 0,9% met gezond en ziek sap, en antiserum met gezond sap), werden geen vlokkingen waargenomen.

In vele andere proeven werden deze resultaten bevestigd.

De ervaringen met het antiserum waren als volgt:

1. Verzadigd antiserum 1 : 1 gaf, met gezond sap samengebracht, een enkele maal vlokkingen, terwijl bij verzadigingen van 1 : 3 en 1 : 7 de vlokkingen steeds achterwege bleven. Wij concluderen hieruit dat bij een verzadiging van 1 : 1 niet steeds alle antilichamen uit het antiserum verdwenen zijn en dus een sterkere verzadiging nodig is om zeker te kunnen zijn van de resultaten.
2. Een verdunning van 32 maal van het verzadigde antiserum, samengebracht met ziek chrysantensap, liet meestal nog een waarneembare reactie zien.
3. Het onverzadigde antiserum gaf met sap van gezonde bladeren, zoals te verwachten was, steeds duidelijke vlokkingen. Het onverzadigde antiserum, 4 maal verdund, liet ook nog vlokking zien, een verdunning van 8 maal echter niet meer. Met ziek sap daarentegen gaf het onverzadigde antiserum in een verdunning van 32 maal nog een duidelijke reactie. In een verdunning van 160 maal werd zelfs nog een vlokking waargenomen, zij het minder duidelijk.

Niet altijd wilde het uitvoeren der precipitatiereactie gelukken. Door het nog

al eens optreden van spontane vlokkingen n.l., die speciaal bij sap van chrysanten voorkwamen, ontstond een vertroebeling van het sap, waardoor een eventuele precipitatiereactie niet meer was te onderkennen.

De spontane vlokkingen bleken in belangrijke mate te worden tegengegaan, door de bladeren vóór het uitpersen, of het sap ná het uitpersen te bevriezen en daarna het sap in een vloeistofkolom van hoogstens 10 mm hoogte gedurende langere tijd (75 minuten) te centrifugeren bij 3000 toeren per minuut (het maximum toerental van de beschikbare centrifuge). Geheel achterwege bleven de spontane vlokkingen nog niet en bovendien bleek de precipitatiereactie door de lange duur van het centrifugeren minder sterk te worden en soms zelfs geheel te verdwijnen. Een mogelijke verklaring hiervoor, zoals reeds bij de zuivering en de electronenmicroscopie werd gegeven, is dat het virus tijdens het centrifugeren voor een belangrijk deel sedimenteert.

Door aan het te centrifugeren sap KCN toe te voegen (enkele druppels KCN 1 : 10.000 voldeed het beste), bleek soms een kortere tijd centrifugeren voldoende om de spontane vlokkingen tegen te gaan, maar ook hier werd de precipitatiereactie weer minder duidelijk.

Door toevoegen vóór het centrifugeren van Calciumsulfaatpoeder of Natriumsulfietoplossing in verschillende concentraties, werd geen verbetering van de precipitatiereactie verkregen; evenmin was dit het geval wanneer het sap vóór het centrifugeren 2 minuten werd verhit tot 50 of 60°C.

Sap van de gele stam No 6 van PRICE van *Cucumis virus 1*, samengebracht met het antiserum van *Cucumis virus 1 st. Chr.* heeft ook na herhaalde pogingen, geen precipitatiereactie gegeven.

Sap met *Cucumis virus 1* van augurk daarentegen reageerde wel, hoewel niet zeer duidelijk, met het antiserum van *Cucumis virus 1 st. Chr.*

Resultaten met de agglutinatiereactie

Het heeft enige moeite gekost voor het uitvoeren van de agglutinatie-reactie een goede methode te vinden. Op de volgende wijze zijn tenslotte in een aantal proeven goede resultaten bereikt:

Gewerkt werd met bladeren van planten van *Nicotiana tabacum* White Burley, die 14 dagen van tevoren met *Cucumis virus 1 st. Chr.* waren geïnoculeerd en duidelijk ziekteverschijnselen vertoonden.

Deze bladeren werden fijngemaakt en uitgeperst door mul, waarna het verkregen sap in een vloeistofkolom van 2 cm hoog gedurende 1 of 2 minuten werd gecentrifugeerd bij 1700 toeren per minuut. Door dit centrifugeren werden slechts weinig chloroplasten neergeslagen, maar wel het meeste zetmeel, waardoor de reactie veel beter was waar te nemen.

De verzadiging van het antiserum geschiedde op een wijze zoals bij de precipitatie-reactie op p. 156 werd vermeld.

Het plaatsen van de celletjes met druppels bij 37°C werd achterwege gelaten, daar na 15–30 minuten reeds bij kamertemperatuur een duidelijke reactie was waar te nemen. Tabel 6 (proef *19*) geeft de resultaten van een op deze wijze uitgevoerde reactie weer.

Tabakssap met *Cucumis virus 1 st. Chr.* gaf met antiserum tot $\frac{1}{8}$ verdund een zeer duidelijke agglutinatiereactie, terwijl zelfs bij een antiserum verdunning van 1 : 256 nog een duidelijke agglutinatie was waar te nemen. In een andere proef agglutineerde ziek sap zelfs nog bij een antiserum verdunning van 1 : 512.

TABEL 6. Agglutinatie-reactie bij 20 °C van sap van Nicotiana tabacum met Cucumis virus 1 st. Chr. + verzadigd antiserum. Waarneming na ½ uur
++ is zeer duidelijke, + duidelijke, 1 vrijwel geen, – geen agglutinatie
Agglutination test at 20 °C with sap of Nicotiana tabacum containing Cucumis virus 1 st. Chr. + saturated antiserum. Observation after ½ hour
++ very distinct, + distinct, 1 virtually no agglutination, – no agglutination

	Antiserum verdunning *Antiserum dilution*	Tabakssap gezond 1 : 3 *Sap of healthy tobacco 1 : 3*	Tabakssap ziek 1 : 3 *Sap of diseased tobacco 1 : 3*
Aq.dest.		–	–
NaCl 0,9%		–	–
Norm. Ser. 1 dl. verz. met 7 dl. sap van tab. gezond		–	–
Antiserum 1 dl. verz. met 7 dl. sap van tab. gezond	1/8	1	++
„ 1 dl. verz. met 7 dl. sap van tab. gezond + 1 dl. aq.dest.	1/16	1	++
„ 1 dl. verz. met 7 dl. sap van tab. gezond + 3 dl. aq.dest.	1/32	1	+
„ 1 dl. verz. met 7 dl. sap van tab. gezond + 7 dl. aq.dest.	1/64	–	+
„ 1 dl. verz. met 7 dl. sap van tab. gezond + 15 dl. aq.dest.	1/128	–	+
„ 1 dl. verz. met 7 dl. sap van tab. gezond + 31 dl. aq.dest.	1/256	–	+
„ 1 dl. verz. met 7 dl. sap van tab. gezond + 63 dl. aq.dest.	1/512	–	1
„ 1 dl. verz. met 7 dl. sap van tab. gezond + 127 dl. aq.dest.	1/1024	–	1
„ 1 dl. verz. met 7 dl. sap van tab. gezond + 255 dl. aq.dest.	1/2048	–	1

De contrôles van gezond sap toonden bij een verdunning van 1:8 tot 1:32 een minimale agglutinatie, terwijl bij de verdere contrôles nergens een reactie te zien was.

Dat bij de contrôles van gezond sap nog een geringe agglutinatie optrad, deed denken aan de mogelijkheid dat het antiserum niet voldoende verzadigd geweest zou zijn. Echter ook bij verzadiging van 1 deel antiserum met 10, 15 of 31 delen in plaats van met 7 delen gezond sap, bleek nog een geringe reactie op te treden. Pas na een verdunning van deze verzadigde antisera met aq. dest. tot een uiteindelijke verdunning van 1:32 (soms 1:64) was geen agglutinatie meer waar te nemen.

Met onverzadigd serum was de sterkste verdunning, waarbij nog een reactie viel waar te nemen, 1:1000; gezond sap agglutineerde in dit geval bij een verdunning van hoogstens 1:64.

Tot nu toe is het met de agglutinatiereactie niet gelukt in sap van zieke chrysanten *Cucumis virus 1 st. Chr.* aan te tonen.

Wel gelukte het de serologische verwantschap van *Cucumis virus 1 st. Chr.* met de gele stam No 6 van PRICE van *Cucumis virus 1* met de agglutinatie-reactie aan te tonen. Hierbij is een antiserum gebruikt dat door VAN DER WANT van deze gele stam was bereid, op dezelfde wijze als dit voor het *Cucumis virus 1 st. Chr.* (p. 156) geschiedde. Een overzicht van dit onderzoek (proef *20*) geeft tabel 7.

Deze proef is enige malen met hetzelfde resultaat herhaald.

Duidelijk blijkt hier dat zowel het *Cucumis virus 1 st. Chr.* met het antiserum

Tabel 7. Agglutinatiereactie bij 25 °C van Nicotiana tabacum met Cucumis virus 1 st. Chr. en van sap van Nicotiana tabacum met de gele stam No. 6 van Price van Cucumis virus 1, samengebracht met antisera van deze twee viren, waarneming na ½ uur ++ zeer duidelijke, + duidelijke, – geen agglutinatie.
Agglutination test at 25 °C with sap of Nicotiana tabacum containing Cucumis virus 1 st. Chr. and with sap of Nicotiana tabacum containing the Yellow Strain of Cucumis virus 1, No. 6 of Price, mixed with antisera of these two viruses; observation after ½ hour. ++ very distinct, + distinct, – no agglutination

	Sap van tabak *Sap of tobacco*					
	Gezond 1 : 1 *Healthy 1 : 1*	Gezond 1 : 3 *Healthy 1 : 3*	Cu. v. 1 st. Chr. 1 : 1 *Cu. v. 1 st. Chr. 1 : 1*	Cu. v. 1 st. Chr. 1 : 3 *Cu. v. 1 st. Chr. 1 : 3*	Gele st. Cu v. 1 1 : 1 *Y. str. Cu. v. 1 1 : 1*	Gele st. Cu. v. 1 1 : 3 *Y. str. Cu. v. 1 1 : 3*
1.	–	–	–	–	–	–
2. NaCl 0,9% . . . . *NaCl 0,9%*	–	–	–	–	–	–
3. Norm. Ser. 1 dl, verz. met 5 dl. sap van gezonde tab. . . . . *Norm. Ser. 1 p., sat. with 5 p. sap of healthy tob.*	–	–	–	–	–	–
4. Antiserum Cu. vir. 1 st. Chr. 1 dl, verz. met 5 dl. sap van gezonde tab. . *Antiserum Cu. vir. 1 st. Chr. 1 p., sat. with 5 p. sap of healthy tobacco*	–	–	++	+	++	++
5. Antiserum gele stam 1 dl, verz. met 5 dl. sap van gezonde tab. . . . . *Antiserum yellow str. 1 p., sat. with 5 p. sap of healthy tobacco*	–	–	+	+	+	+
6. Onverz. antiserum Cu. vir. 1 st. Chr. 1 dl + 5 dl. NaCl 0,9% . . . . . *Unsaturated antiserum Cu. vir. 1 st. Chr. 1 p. + 5 p. NaCl 0,9%*	++	++	++	++	++	+

van de gele stam No 6 van Price, als het virus van de gele stam No 6 van Price met het antiserum van het *Cucumis virus 1 st. Chr.* agglutineren.

Door de uitkomst van deze proeven wordt op overtuigende wijze de serologische verwantschap tussen het *Cucumis virus 1 st. Chr.* en de gele stam No 6 van Price van *Cucumis virus 1* bewezen.

Nabespreking

Wat de serologie betreft, is over het virus van chrysanten uit de literatuur niets bekend, wel is serologisch onderzoek verricht met *Cucumis virus 1* van andere gewassen.

De gegevens zijn echter schaars, Birkeland (1934), Chester (1937), Grancini en Cesaroni (1950), Nienow (1948), blijkbaar doordat het vele onderzoekers niet gelukte een antiserum van dit virus te bereiden, Bawden (1950, p. 273), Bhargava (1951).

Het lijkt wel waarschijnlijk dat het mislukken van de pogingen van deze onderzoekers ons een werkzaam antiserum te bereiden, zijn oorzaak vindt in het feit, dat sap met *Cucumis virus 1* gemakkelijk zijn infectievermogen verliest. Nienow (1948) wijst er bijvoorbeeld op dat bevriezen het virus vernietigt. Bovendien werd door Sill, Burger, Stahman & Walker (1952) aangetoond, dat *Cucumis*

virus 1 door centrifugeren reeds bij lage snelheden uit de vloeistof verdween Aan VAN DER WANT (mondelinge mededeling) en ook aan mij bleek dat de gele stam No 6 van PRICE van *Cucumis virus 1* zijn infectievermogen volledig verloor, indien het virusbevattende sap zolang gecentrifugeerd werd tot het helder was. Met *Cucumis virus 1 st. Chr.* werd af en toe dezelfde ervaring opgedaan; zie zuivering en electronenmicroscopie.

De voor het verkrijgen van een reactie nog toelaatbare verdunning van het antiserum is bij de agglutinatiereactie veel groter dan bij de precipitatiereactie. De oorzaak hiervan kan gezocht worden in het centrifugeren, waarbij, zoals reeds eerder bleek, het virus gedeeltelijk en soms geheel uit de vloeistof kan verdwijnen.

Mogelijk is hiermede ook een verklaring te geven voor de weinig duidelijke precipitatiereactie die verkregen werd na samenbrenging van het antiserum van *Cucumis virus 1 st. Chr.* met sap van *Cucumis virus 1* van augurk en voor het wegblijven van de reactie met sap van de gele stam No 6 van PRICE van *Cucumis virus 1*.

De agglutinatie-reactie van de gele stam No 6 van PRICE was daarentegen zeer duidelijk en hiermede kon de serologische verwantschap tussen het *Cucumis virus 1 st. Chr.* en de gele stam No 6 van PRICE worden aangetoond.

CHESTER (1937) vond serologische verwantschap van de gele stam No 6 van PRICE met PORTER's *Cucumis virus 1*. NIENOW (1948) toonde serologische verwantschap aan tussen een virus van Mertensia en *Cucumis virus 1*. Deze onderzoekingen doen vermoeden dat de serologische verwantschap van *Cucumis virus 1 st. Chr.* zich niet beperkt tot de gele stam No 6 van PRICE van *Cucumis virus 1*, maar ook bestaat ten opzichte van andere stammen van het *Cucumis virus 1*.

Toch is het de vraag of alle stammen van het *Cucumis virus 1* serologisch verwant zijn. CHESTER (1937) kon namelijk van bepaalde stammen geen serologische verwantschap aantonen, zodat het twijfelachtig is of alle viren die op grond van de ziekteverschijnselen of van premuniteitsonderzoek tot *Cucumis virus 1* gerekend worden, serologisch met elkaar verwant zijn.

G. OVERBRENGING VAN CUCUMIS VIRUS 1 VAN CHRYSANT DOOR BLADLUIZEN

Teneinde te weten te komen of *Cucumis virus 1 st. Chr.* door bladluizen wordt overgebracht, zijn enkele proeven verricht met *Myzus persicae* SULZ., die mij door de heer D. HILLE RIS LAMBERS waren toegestuurd [1]).

Een aantal bladluizen van de soort *Myzus persicae*, voortgekweekt op *Solanum capsicastrum*, werden met een penseel overgebracht in een petrischaal, waarin zij 1 à $1\frac{1}{2}$ uur verbleven zonder voedsel op te nemen. Daarna zijn deze bladluizen met een penseel, in een aantal van 5 tot 10 per plant, op *Nicotiana tabacum* of *Chrysanthemum indicum* met *Cucumis virus 1 st. Chr.* gezet en na 2 minuten zuigen op gezonde planten van *Nicotiana tabacum* „White Burley", *N. glutinosa* en *Petunia hybrida nana compacta* „Celestial" overgebracht. In de 3 eerste proeven werden de toetsplanten met het penseel aangeraakt, in de laatste proef (*24*) is iedere aanraking der toetsplanten vermeden.

Het resultaat van deze proeven ziet men in tabel 8.

Uit tabel 8 blijkt duidelijk dat *Myzus persicae* in staat is het *Cucumis virus 1 st. Chr.* zowel van tabak als van chrysant op andere planten over te brengen, terwijl te constateren valt, dat *Myzus persicae* na een zuigtijd van 2 minuten op de infectiebron, reeds infectieus kan zijn.

---

[1]) Waarvoor ik de Heer HILLE RIS LAMBERS gaarne mijn dank betuig.

TABEL 8. Overbrenging van Cucumis virus 1 st. Chr. door Myzus persicae
Transmission of Cucumis virus 1 st. Chr. by Myzus persicae

Proef *Exper.*	Datum *Date*	Infectiebron *Source plant*	Zuigtijd in minuten *Feeding period in minutes*	Toetsplant *Test plants*	Zuig-tijd in uren *Feed. period in hrs*	Planten [1]) geïnfecteerd *Plants [1]) infected*
21 . . .	16-12-'50	Nic. tabacum	2	N. tabacum	5	0/2
				Petunia hybr.	5	1/2
22 . . .	19-12-'50	Nic. tabacum	2	N. tabacum	5	2/2
				N. tabacum	5	1/2
23 . . .	29-12-'50	Nic. tabacum	2	N. tabacum	120	5/9
24 . . .	17- 1-'51	Nic. tabacum	2	N. glutinosa	–	6/10
		Chrys. indicum	2	N. glutinosa	–	5/6

[1]) Noemer: aantal door luis geïnoculeerde, teller: aantal geïnfecteerde planten.
Number of plants infected, over number exposed.

H. Premuniteit van cucumis virus 1 van chrysant ten opzichte van 2 andere stammen van cucumis virus 1

In het hoofdstuk: Sapinoculatie op toetsplanten (p. 144) is er op gewezen dat het chrysantenvirus overeenkomst vertoonde met *Cucumis virus 1*, maar ook zodanig verschilde dat het virus alleen op grond van de waargenomen verschijnselen niet geheel met zekerheid was te identificeren.

De feitelijke identificatie van het chrysantenvirus met *Cucumis virus 1* werd echter verkregen met behulp van de serologie (p. 160) en door de proeven omtrent premuniteit, die hieronder volgen.

Met „premuniteit", een juistere term door Quanjer (1942) ingevoerd voor „acquired immunity", wordt aangeduid de onvatbaarheid van een plant voor een virus, dat verwant is aan het virus dat reeds in die plant aanwezig is. Voor viren, waarvan de verwantschap niet bekend of twijfelachtig is, kunnen kruisinoculaties de onderzoeker in staat stellen een eventuele verwantschap vast te stellen. Beschermt het virus in een plant deze tegen een volgende infectie met een ander, dan worden deze viren verwant genoemd. Is er daarentegen van bescherming geen sprake, dan mag zonder meer niet gezegd worden, dat de viren niet-verwant zijn. Dit laatste blijkt uit talrijke onderzoekingen. Voor de uitgebreide literatuur over dit onderwerp wordt hier verwezen naar enkele samenvattende publicaties, als Bawden (1950, p. 118–124), Price (1940) en Thung (1949, p. 78–84).

In de literatuur nu zijn talrijke stammen van *Cucumis virus 1* beschreven, die sterk kunnen verschillen in hun reactie op toetsplanten, maar die op grond van hun premuniserend vermogen bij kruisinoculaties door de auteurs toch tot *Cucumis virus 1* gerekend worden, Price (1935, 1937, 1939), Ainsworth (1938), Nienow (1948), Fulton (1950), Anderson (1951), Bhargava (1951), Faan & Johnson (1951).

K. M. Smith (1949, p. 128), die in chrysanten een virus aantrof, dat op *Nicotiana glutinosa* dezelfde verschijnselen vertoonde als *Cucumis virus 1 st. Chr.* constateerde dat zijn chrysantenvirus in *Nicotiana glutinosa* de infectie met een gele stam van komkommermozaïekvirus onmogelijk maakte. Op grond hiervan concludeert Smith, dat zijn chrysantenvirus een stam is van het

Cucumis virus 1. Soortgelijke kruisinoculaties met een in chrysanten voorkomend virus en met *Cucumis virus 1* werden verricht door BLENCOWE & CALDWELL (1949) en BRIERLEY & SMITH (1951 *b*), echter met ander resultaat (zie p. 120 e.v.).

Om met behulp van het premuniteitsbeginsel het bestaan van een verwantschap van ons chrysantenvirus met *Cucumis virus* 1 aan te tonen, zijn door mij een aantal kruisinoculaties verricht.

Hierbij werden de volgende viren gebruikt:

1. Ons chrysantenvirus, d.w.z. *Cucumis virus 1 st. Chr.* (om verwarring te voorkomen wordt in dit hoofdstuk over „het chrysantenvirus" gesproken, als *Cucumis virus 1 st. Chr.* bedoeld is).
2. Een gele stam van komkommermozaïekvirus (mij toegestuurd door K. M. SMITH, Cambridge) [1]). Deze gele stam is identiek met de gele stam No 6 van PRICE van *Cucumis virus 1*, PRICE (1934).
3. Augurkenmozaïekvirus, een stam van *Cucumis virus 1* (mij verschaft door F. TJALLINGII, Venlo) [2]), TJALLINGII (1949).

TABEL 9. Verschijnselen op Nicotiana glutinosa en N. tabacum van de 3 viren, die in de kruisinoculatieproeven werden gebruikt.
Symptoms on Nicotiana glutinosa and N. tabacum from the 3 viruses used in the cross-inoculation tests

Toetsplant *Test plant*	Chrysanten virus *Virus from Chrysanthemum*	Geel komkommermozaïekvirus *Yellow cucumber mosaic virus*	Augurkenmozaïekvirus *Gherkin mosaic virus*
Nicotiana glutinosa	1. groen bobbelig mozaïek *green mosaic with leaf blisters* 2. sterke deformatie en bladversmalling *marked malformation and narrowing of leaves* 3. zeer sterke groeiremming *very marked dwarfing*	1. geel bobbelig mozaïek *yellow mosaic with leaf blisters* 2. matige deformatie en bladversmalling *moderate malformation and narrowing of leaves* 3. vrij zwakke groeiremming *slight dwarfing*	1. zwak mozaïek zonder bobbeling *slight mosaic without blisters* 2. vrijwel normale bladvorm *almost normal shape of leaf* 3. matige groeiremming *moderate dwarfing*
Nicotiana tabacum "White Burley"	1. mozaïek van geel en groengeel, ronde geelgroene vlekken *green and yellowish-green mosaic with round yellowish-green spots* 2. blad bobbelig, enige deformatie van bladrand *leaf with blisters, some deformation of the margins of the leaves*	1. geel tot wit mozaïek van scherphoekige vlekken *yellowish-white mosaic with angular spots* 2. blad vlak, geen deformatie, soms toegespitste bladtop *leaf flat, no deformation, sometimes apex abnormally pointed*	1. zeer onduidelijk mozaïek, later meestal geheel afwezig *very inconspicuous mosaic, later usually no symptoms* 2. blad vlak, geen deformatie *leaf flat, no deformation*

[1]) I am much indebted to DR K. M. SMITH for sending me the diseased material.

[2]) Waarvoor ik de heer TJALLINGII gaarne mijn dank betuig.

De kruisinoculaties met bovengenoemde 3 viren werden uitgevoerd op *Nicotiana glutinosa* en *N. tabacum* „White Burley".

Daar hoofdzakelijk op grond van de verschijnselen die deze 3 viren veroorzaken, bepaald werd, welke viren in de toetsplanten aanwezig waren, volgt in tabel 9 een korte, vergelijkende beschrijving van deze verschijnselen.

Het chrysantenvirus en de gele stam van *Cucumis virus 1* blijken dus duidelijk herkenbare verschijnselen te vertonen in de gebruikte toetsplanten. De aanwezigheid van augurkenmozaïekvirus was, in planten met één der twee andere viren, echter alleen te herkennen wanneer het virus volledig ging overheersen en dus de verschijnselen van het chrysantenvirus of de gele stam van *Cucumis virus 1* verdwenen. Bij het beoordelen der resultaten van proef *25* en *26* (tabel 10 en 11) moet men dit in aanmerking nemen.

Proef *25*. Van 36 planten *Nicotiana tabacum* „White Burley" werden op 23-10-'50 telkens 12 geïnoculeerd met sap van een der 3 bovengenoemde viren. Alle planten vertoonden 7-11-'50 symptomen van het virus waarmede zij waren geïnoculeerd. Iedere groep van 12 werd 7-11-'50 weer verdeeld in 3 groepen van 4 planten, welke respectievelijk met de 3 viren werden geïnoculeerd. De verschijnselen die de planten vertoonden, werden aangetekend tot half Februari toe en zijn samengevat in tabel 10.

TABEL 10. Symptomen bij telkens 4 planten Nicotiana tabacum „White Burley" op de bladeren, die zich na de 2e inoculatie met een der 3 viren hadden ontwikkeld. Deze 3 viren, augurkenmozaïekvirus, gele stam van komkommermozaïekvirus en het chrysantenvirus zijn in de tabel respectievelijk aangeduid met de afkortingen: Aug. moz. vi., Geel k.moz.vi. en Chr. vi.
Symptoms on 4 plants of Nicotiana tabacum „White Burley" on leaves developed after the 2nd inoculation with one of the 3 viruses. These 3 viruses, mosaic virus from gherkin, yellow strain of cucumber mosaic virus and virus from Chrysanthemum are designated in the table, resp. with the abbreviations: Gherkin mos.vi., Yellow cu.mos.vi. and Chr. vi.

1e inoculatie *1st inoculation* 23-10-'50	2e inoculatie *2nd inoculation* 7-11-'50: Augurkenmozaïekvirus *Gherkin mosaic virus*	Geelkomkommer mozaïek virus *Yellow cucumber mosaic virus*	Chrysanten virus *Virus from Chrysanthemum*
Augurkenmozaïekvirus *Gherkin mosaic virus*	4 Aug.moz.vi *4 Gherkin mos. vi.*	4 Aug.moz.vi. *4 Gherkin mos. vi.*	4 Aug.moz.vi. *4 Gherkin moz. vi.*
Geel komkommermozaïek-virus *Yellow cucumbermosaic virus*	4 Geel k.moz.vi. *4 Yellow cu.mos.vi.*	4 Geel k.moz.vi. *4 Yellow cu.mos.vi.*	3 Geel. k.mos.vi. 1 mengverschijnsel. *3 Yellow cu.mos.vi.* *1 mixed symptoms*
Chrysantenvirus *Virus from Chrysanthemum*	4 Chr.vi. *4 Chr.vi.*	1 Chr.vi. 3 mengverschijns. *1 Chr.vi.* *3 mixed symptoms*	4 Chr.vi. *4 Chr.vi.*

Uit deze proef blijkt duidelijk dat ieder der 3 viren in staat is om de plant min of meer te beschermen tegen een latere inoculatie met een der beide andere viren. De bescherming was bij augurkenmozaïek volledig, maar bij geel komkommermozaïek vertoonde één plant mengverschijnselen van geel komkommermozaïekvirus en het chrysantenvirus, terwijl bij het chrysantenvirus 3 van

de 4 planten mengverschijnselen vertoonden van het chrysantenvirus met geel komkommermozaïekvirus.

Geheel op dezelfde wijze en tegelijkertijd met *Nicotiana tabacum* is *N. glutinosa* geïnoculeerd. Ook het resultaat van deze inoculaties gaf de indruk dat infectie met één virus de plant tegen een volgende infectie met een der beide andere viren beschermde. Daar een deel der planten echter dood ging, blijkbaar door inoculatie op een te jong stadium, wordt van een verdere beschrijving van deze proef afgezien.

Proef *26*. Hierbij is de tweede inoculatie niet na 2 weken als in proef *25*, doch na 3 weken uitgevoerd. *Nicotiana tabacum* „White Burley" en *N. glutinosa* dienden als proefplanten.

Voor een deel der proefplanten werd, behalve op grond van de verschijnselen, ook door inoculatie op toetsplanten (*Nicotiana tabacum*, *N. glutinosa* en *Cucumis sativus*) tot aanwezigheid van één of twee viren geconcludeerd. Op deze wijze kon bijvoorbeeld de aanwezigheid van augurkenmozaïekvirus aangetoond

TABEL 11. Symptomen bij telkens 4 planten Nicotiana tabacum „White Burley" en N. glutinosa op de bladeren die zich na de 2e inoculatie met 3 viren (augurkenmozaïekvirus, gele stam van komkommermozaïekvirus en het chrysantenvirus) hadden ontwikkeld. Afkortingen als in tabel 10
Symptoms on 4 plants every of Nicotiana tabacum „White Burley" and N. glutinosa on leaves developed after the 2nd inoculation with the 3 viruses (Gherkin mosaic virus, Yellow strain of cucumber mosaic and the virus of Chrysanthemum. Abbreviations as in table 10

Toetsplant *Test plant*	1e inoculatie *1st inoculation* 5-2-'51	2e inoculatie *2nd inoculation* 26-2-'51		
		Augurken mozaïekvirus *Gherkin mosaic virus*	*Geelkomkommer mozaïekvirus Yellow cucumber mosaic virus*	Chrysantenvirus *Virus from Chrysanthemum*
N. tabacum	Augurken-mozaïekvirus *Gherkin mosaic virus*	4 Aug.moz.vi. *4 Gherkin mos.vi*	4 mengverschijns. *4 mixed symptoms*	3 Aug.moz.vi. 1 mengverschijns. *3 Gherkin mos.vi 1 mixed symptoms*
	Geel komkommer-mozaïek virus *Yellow cucumber mosaic virus*	4 Geel k.moz.vi. *4 Yellow cu. mos. vi.*	4 Geel k.moz.vi. *4 Yellow cu. mos. vi.*	4 Geel k.moz.vi. *4 Yellow cu. mos. vi.*
	Chrysantenvirus *Virus from Chrysanthemum*	4 Chr.vi. *4 Chr.vi.*	1 Chr.vi. 3 mengverschijns. *1 Chr.vi. 3 mixed symptoms*	4 Chr.vi. *4 Chr.vi.*
N. glutinosa	Augurken-mozaïekvirus *Gherkin mosaic virus*	4 Aug.moz.vi. *4 Gherkin mos.vi.*	4 Aug.moz.vi. *4 Gherkin mos.vi.*	4 Aug.moz.vi. *4 Gherkin mos.vi.*
	Geel komkommer-mozaïek virus *Yellow cucumber mosaic virus*	4 Geel k.moz.vi. *4 Yellow cu. mos.vi.*	4 Geel k.moz.vi. *4 Yellow cu. mos.vi.*	4 Geel k.moz.vi. *4 Yellow cu. mos.vi.*
	Chrysanten virus *Virus from Chrysanthemum*	3 Chr. vi. 1 Aug. moz. vi. *3 Chr.vi. 1 Gherkin mos.vi.*	3 Chr. vi. 1 mengverschijns. *3 Chr. vi. 1 mixed symptoms*	4 Chr. vi. *4 Chr. vi.*

worden in een plant die eerst met het chrysantenvirus en vervolgens met augurkenmozaïekvirus was geïnoculeerd.

De resultaten van de proef zijn samengevat in tabel 11.

De tweede inoculatie van 26-2-'51 is, behalve op de in tabel 11 weergegeven proefplanten ook uitgevoerd op even oude, gezonde planten bij wijze van blanco-proef. Al deze planten toonden naderhand ziekteverschijnselen van het virus, waarmee zij waren geïnoculeerd.

Ook hier blijkt, evenals uit proef *25*, dat de aanwezigheid van één der viren de plant kan beschermen tegen de andere viren. Evenwel blijkt ook uit deze proef, dat de beschermende werking niet steeds aanwezig was. Augurkenmozaïek op *Nicotiana tabacum* beschermde niet tegen geel komkommermozaïek, terwijl het in 3 planten van de 4 wel tegen het chrysantenvirus beschermde. Geel komkommermozaïek beschermde volledig tegen de beide andere viren. Het chrysantenvirus daarentegen beschermde in 3 van de 4 planten niet tegen geel komkommermozaïek.

In *Nicotiana glutinosa* bleek premuniteit in sterker mate aanwezig te zijn, daar slechts 2 van de 36 planten geen bescherming gaven tegen het virus dat bij de tweede inoculatie op de planten gebracht werd. In één plant met het chrysantenvirus werd dit virus door augurkenmozaïek verdrongen, terwijl één plant met het chrysantenvirus niet tegen geel komkommermozaïek beschermde.

Samenvattend kan gezegd worden dat de 3 viren de plant als regel beschermen tegen een latere infectie met deze viren. Het chrysantenvirus bezit deze beschermende eigenschap ten opzichte van geel komkommermozaïek in geringere mate. Van de in totaal 12 planten met het chrysantenvirus, bij welke de tweede inoculatie met geel komkommermozaïekvirus plaats vond, vertoonden er namelijk 7 naderhand ook verschijnselen van geel komkommermozaïekvirus. Van een verdringing, na de tweede inoculatie, van het chrysantenvirus door een der twee andere viren kon echter niet gesproken worden; de viren bleven steeds naast elkaar aanwezig in de planten. Slechts bij de plant met het chrysantenvirus, die naderhand werd geïnoculeerd met augurkenmozaïekvirus bleek bij inoculatie op toetsplanten in de topbladeren uitsluitend dit laatste virus aanwezig te zijn.

Nabespreking

Op grond van dit premuniteitsonderzoek komen we tot de conclusie dat de 3 onderzochte viren verwantschap met elkaar vertonen.

De vraag rijst hier echter of de waarneming dat er enkele planten waren die geen premuniteit vertoonden, als een argument tegen deze verwantschap beschouwd moet worden. Dat hiertoe geen noodzaak bestaat, bewijzen talrijke vermeldingen in de literatuur van viren die een plant niet of niet altijd premuun maken tegen een infectie van een verwant virus. BAWDEN (1934), GIDDINGS (1938, 1940, 1941), HOLMES (1934), JOHNSON & VALLEAU (1935), KÖHLER (1935), KUNKEL (1934), SALAMAN (1938), SMITH (1951), THUNG (1937, 1938).

THUNG (1937, 1938, 1939) wijst er op, dat het wel voorkomt dat het ene virus wel tegen het andere beschermt, maar niet omgekeerd, tengevolge van een gradatie in premuniserend vermogen. Bij de reacties van het geel komkommermozaïek en het chrysantenvirus is naar mijn mening ook sprake van afdalende sterkte in premuniteit.

Algemeen wordt door virologen het principe voorgestaan om viren die serologisch en (of) premunologisch verwant zijn te classificeren tot één virus of één

groep van viren (verg. BAWDEN 1950 p. 270 e.v.; THUNG 1949, p. 84 e.v.). Zo werden onder *Cucumis virus 1* een aantal viren gerangschikt op grond van premuniteitsonderzoek door PRICE (1935, 1937, 1939), AINSWORTH (1938), NIENOW (1948), FULTON (1950), ANDERSON (1951) en BHARGAVA (1951).

Het lijkt mij daarom juist ook het chrysantenvirus in navolging van SMITH (1949), op grond van het in dit hoofdstuk beschreven premuniteitsonderzoek en tevens op grond van de serologische resultaten, te rekenen tot het *Cucumis virus 1*. Wegens de sterk afwijkende reactie op enkele toetsplanten dient het chrysantenvirus echter als een aparte stam beschouwd te worden, en is daarom in dit onderzoek aangeduid als *Cucumis virus 1 st. Chr.*

V. VIRUS B

A. Sapinoculatie met virus b op toetsplanten

Inleiding

Op p. 132 is reeds vermeld dat met sap van bepaalde chrysanten op *Petunia* een locale reactie opgewekt kon worden, veroorzaakt door een virus dat werd aangeduid als *virus b*.

Om geschikte toetsplanten te vinden en het virus zo mogelijk te identificeren, werden sapinoculaties uitgevoerd op 31 plantensoorten, op dezelfde wijze als beschreven is op p. 132.

Anders dan bij *Cucumis virus 1 st. Chr.*, waar het virus zich in de toetsplant verspreidde en dus in de toetsplant een behoorlijke hoeveelheid virus voor de inoculatie ter beschikking stond, waren bij *virus b* tot nu toe slechts locale reacties en geen spreidsymptomen op de tot dusver gevonden toetsplanten (o.a. *Petunia*) bekend, waardoor het niet mogelijk was een geïnfecteerde toetsplant voor de vrij omvangrijke inoculatieproeven te gebruiken.

Hier volgt een beschrijving van de ziektesymptomen die door *virus b* bij 7 van de 31 geïnoculeerde plantensoorten werden veroorzaakt, terwijl tenslotte een opsomming volgt van de plantensoorten, bij welke geen of een onduidelijke reactie werd waargenomen.

Antirrhimum maximum album

Vier van de 5 planten vertoonden op de geïnoculeerde bladeren na ruim 5 weken 2–7 ronde, geelgroene vlekken van ongeveer $\frac{1}{2}$ cm diam.

Calendula officinalis

Bij 4 der 5 planten waren $2\frac{1}{2}$ maand na de inoculatie spreidsymptomen zichtbaar, namelijk bruin necrotische vlekken van ongeveer 1 mm., omgeven door geel weefsel of soms door een necrotische ring.

Sapinoculatie van deze planten gaf op *Petunia virus b*-reactie.

Callistephus sinensis Dwerg Allerheiligen

Bij alle 5 planten vergeelden, 6 weken na inoculatie, de geïnoculeerde bladeren met grote vaag begrensde of, bij jongere bladeren, kleinere scherper begrensde vlekken. De niet geïnoculeerde bladeren vertoonden een vrij duidelijk mozaïek. De groei der planten was meer gedrongen dan normaal. Sapinoculatie gaf op *Petunia* slechts een twijfelachtige reactie van *virus b*.

Chrysanthemum indicum (zie p. 170).

Helichrysum bracteatum monstrosum fl. pl. gemengd

Beschrijving naar de verschijnselen op talrijke planten.

Na 12 tot 16 dagen ontstaan op de geïnoculeerde bladeren 1 tot 3, of hoogstens

10 bruine tot zwarte vlekken, die zich gaan uitbreiden; nerfnecrose en afsterven van deze bladeren volgt (Fig. 29).

Bij 5 planten van welke het verloop van de verschijnselen verder werd gevolgd, bleek het virus zich door de plant verspreid te hebben en uitte zich in een geremde groei van de plant en een vroegtijdig afsterven van de onderste niet-geïnoculeerde bladeren. Inoculatie met sap van niet geïnoculeerde bladeren gaf *virus b*-reactie op *Petunia*.

De duidelijkheid der reactie op de geïnoculeerde bladeren zou *Helichrysum* zeer geschikt maken om als toetsplant gebruikt te worden. Al te dikwijls echter blijft de reactie geheel achterwege, of beperkt zich tot een enkele vlek.

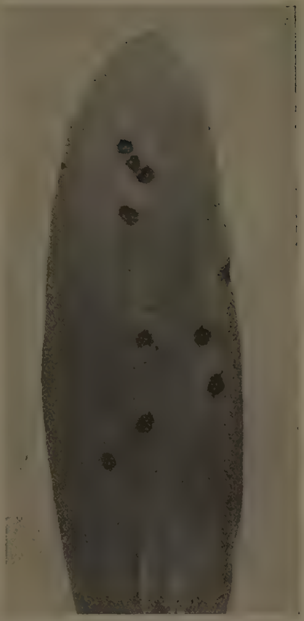


Fig. 29.
Helichrysum bracteatum. Met virus b geïnoculeerd blad: Zwartbruine necrotische vlekken, 2½ week na sapinoculatie.
Helichrysum bracteatum. Leaf inoculated with virus b: Blackish-brown necrotic spots, 2½ weeks after sap inoculation.

Nicotiana glutinosa

Van de talloze keren dat *Nicotiana glutinosa* werd geïnoculeerd is slechts bij uitzondering na 3 of 4 weken een reactie waargenomen op de geïnoculeerde bladeren, bestaande uit vaag begrensde, iets lichter groene vlekken van 2–3 mm diam. Sapinoculatie van de geïnoculeerde bladeren gaf *virus b*-reactie op *Petunia*.

Petunia hybrida nana compacta

De verschijnselen worden hier beschreven naar waarnemingen in talloze proeven.

Na 3 weken, soms reeds eerder (na 2½), of later (na 4 weken), worden op de geïnoculeerde bladeren gele vlekjes zichtbaar.

De vlekken, die in een aantal van 1 tot 10, (soms echter meer, tot een aantal van 50 toe) aanwezig zijn, hebben een diameter van ½–2 mm (Fig. 21).

Op de onderste bladeren der plant zijn de vlekjes groter, vager begrensd en dikwijls minder scherp afstekend (door de bleker groene kleur van het blad) dan op de jongere bladeren (Fig. 20). Vaak zijn op de oudste bladeren de vlekjes al zeer spoedig bruin necrotisch en volgt een afsterven van deze bladeren.

Op de jongere bladeren blijven de gele vlekjes echter enkele weken zichtbaar, totdat na bijvoorbeeld 6 weken, het gehele blad vergeelt. Als overgang tussen de reactie op de oudste en de jongere bladeren is te beschouwen het een enkele maal voorkomende verschijnsel van gele, naast bruingrijze of bruine necrotische vlekken (Fig. 20), welke laatste zich soms in de nerven voortzetten. Op de niet geïnoculeerde bladeren werd nooit een reactie waargenomen.

Het aantal vlekken, dat op de bladeren verschijnt, bleek in sterke mate afhankelijk te zijn van het jaargetijde waarin de inoculatie werd verricht; van Mei tot September was soms bij een deel der toetsplanten in het geheel geen reactie

waar te nemen of viel slechts een vage weinig overtuigende vergeling van grotere delen van het blad te constateren.

Sapinoculatie van geïnoculeerde *Petunia*-bladeren gaf weer de *virus b*-reactie op *Petunia*, terwijl sap van niet-geïnoculeerde bladeren nooit een reactie gaf.

De volgende twee proeven werden gedaan om te onderzoeken of er een variëteit van *Petunia hybrida nana compacta* het meest geschikt is om als toetsplant te gebruiken.

Proef *27* (1-5-'51.) 4 Weken na sapinoculatie werden op 10 planten van de variëteit Celestial in totaal 11, en op 10 planten van de variëteit Hemelroosje in totaal 20 gele vlekken geteld. Hemelroosje leek dus iets gunstiger te reageren dan Celestial, maar vertoonde daarentegen meer vergeling van de bladeren, wat de reactie aan duidelijkheid deed verliezen.

Proef *28* (15-5-'52). 4 planten van de variëteiten Celestial, Howard Star, Rosy Morn en Sneeuwbal vertoonden alle na sapinoculatie slechts enkele gele vlekjes. Geen van deze variëteiten bleek dus voor toetsplant een grotere geschiktheid te bezitten.

Geen enkele variëteit gaf ook een belangrijk duidelijker differentiatie in verschijnselen te zien van *Cucumis virus 1 st. Chr.* en *virus b*, wanneer deze tegelijkertijd waren geïnoculeerd.

Een enkele inoculatie op telkens 5 planten van *Adonis aestivalis*, *Ageratum mexicanum*, *Calliopsis lanceolata*, *Chrysanthemum carinatum*, *C. leucanthemum C. segetum*, *Cucumis sativus*, *Datura stramonium*, *Dianthus barbatus*, *Doronicum caucasicum*, *Gaillardia grandiflora*, *Gerbera jamesonii*, *Helianthus annuus*, *Iberis coronata*, *Matricaria eximia*, *Nicotiana tabacum*, *Papaver nudicaule*, *Primula obconica*, *Senecio cruentus*, *Solanum capsicastrum*, *Solanum Lycopersicum*, *Tagetes patula*, *Tropaeolum majus* en *Zinnia elegans* gaf geen of een zeer twijfelachtige reactie.

Wat de geschiktheid betreft om als toetsplant van *virus b* gebruikt te worden, blijkt dat alleen *Petunia hybrida nana compacta* (indien bij de te onderzoeken plant tenminste *Cucumis virus 1 st. Chr.* ontbreekt) hiervoor in aanmerking kan komen. *Helichrysum bracteatum*, die nog sneller dan *Petunia* en zeer duidelijk een reactie geeft, zou, ook bij aanwezigheid van *Cucumis virus 1 st. Chr.*, als toetsplant bijzonder geschikt kunnen zijn, was het niet dat bij deze plant maar al te dikwijls de reactie achterwege blijft.

B. Sapinoculatie op chrysanthemum indicum met virus b

Met hetzelfde doel, op dezelfde wijze en op dezelfde tijd als voor *Cucumis virus 1 st. Chr.* geschied is (zie p. 145), zijn zaailingen en chrysantenvariëteiten geïnoculeerd met sap van chrysanten, in welke *virus b* was aangetroffen.

a. Sapinoculatie op zaailingen.

Op de bladeren zijn geen ziekteverschijnselen opgetreden, maar 6 van de 24 planten hadden bloemen die vlekkerig of min of meer gedraaid waren.

Bij sapinoculatie bleken deze en ook nog 5 planten zonder ziekteverschijnselen *virus b* te bevatten. Van 4 planten was de reactie op toetsplanten twijfelachtig, van de overige 9 negatief; één der 24 planten bleek door *Cucumis virus 1 st. Chr.* aangetast te zijn. Geen der 24 contrôleplanten was door *virus b* aangetast.

Drie van deze contrôleplanten, waarvan één door *Cucumis virus 1 st. Chr.* was aangetast en één een twijfelachtige reactie gaf, toonden onregelmatigheden in de bloem.

Duidelijk blijkt dat *Chrysanthemum indicum* door sapinoculatie met *virus b* ziek te maken is, maar door het sterk verschillend uiterlijk der zaailingen is niet precies te zeggen, welke afwijkingen in de bloemen ten gevolge van de infectie met *virus b* ontstonden.

b. Sapinoculatie op chrysantenvariëteiten

Daar de voor sapinoculatie met *virus b* bestemde planten van 4 variëteiten alle reeds door *virus b* aangetast bleken te zijn, konden geen proeven genomen worden om door sapinoculatie uit te maken welke verschijnselen bij bepaalde variëteiten door *virus b* veroorzaakt kunnen worden.

Wel werden (13-6-'51) telkens 10 jonge planten, afkomstig van door *virus b* aangetaste Miss Wilcox met rode bloemen, geïnoculeerd met sap van gestreepten geelbloeiende Miss Wilcox (zie voor ziektebeeld p. 134). Nooit is naderhand, ook niet tijdens de bloei in November, enig verschil opgetreden tussen de geinoculeerde planten en de contrôle; alle planten hadden normaal rode bloemen, geen enkele gestreepte of gele. Het is niet duidelijk wat de oorzaak kan zijn dat de streping en de gele kleur niet was op te wekken.

Mogelijk betreft het hier een geval van „premuniteit". De rood bloeiende planten waren reeds door *virus b* aangetast en het is mogelijk dat dit virus de planten beschermde tegen een andere stam van *virus b*, die de gele kleur in Miss Wilcox opwekt.

C. Eigenschappen van virus b in perssap

a. Verdunningsgrens

In proef *29* (20-9-'51) werd onverdund sap en sap verdund tot 1:100 en 1:10.000 op telkens 5 *Petunia*'s geïnoculeerd, maar naderhand werd bij geen enkele plant een duidelijke reactie van *virus b* waargenomen.

In proef *30* (9-11-'51) werd slechts onverdund en 1:10 verdund sap op telkens 5 *Petunia*'s geïnoculeerd. Het aantal gele vlekken, als reactie van *virus b*, bedroeg naderhand voor onverdund sap in totaal 24, voor 1:10 verdund sap 11.

Het aantal proeven is te gering om bepaalde conclusies te trekken aangaande de verdunningsgrens van sap met *virus b*.

Op grond van ervaringen bij vele sapinoculaties, is het ook hier wel waarschijnlijk dat de verdunningsgrens verschillend zal zijn al naar de tijd van het jaar waarin de proef genomen wordt.

Het onderzoek dat het laatste halfjaar tengevolge van het ongunstige jaargetijde geen resultaten afwierp, zal in gunstiger maanden worden voortgezet.

b. Inactiveringstemperatuur

Proef *31* (9-4-'51). Bladeren van de chrysantenvariëteit Miss Wilcox met *virus b* werden in een mortier fijn gemaakt, door mul geperst en verdeeld over 5 buisjes. Ditzelfde werd gedaan met bladeren van dezelfde chrysanten, waaraan vóór het uitpersen per 100 g, 1 g Natriumsulfiet ($Na_2SO_3 \cdot 7H_2O$) werd toegevoegd. Alle buisjes werden, voor en na de verhitting, tot aan de inoculatie in ijs

bewaard. De buisjes van ieder der twee series werden respectievelijk verhit tot 30, 40, 50, en 60 °C. Na afloop van de verhitting van alle buisjes, vond de inoculatie plaats op alle bladeren (6 tot 8) van telkens 5 planten *Petunia hybrida nana compacta* „gemengd".

Na 4 en 5 weken werd het aantal gele vlekjes op de geïnoculeerde bladeren geteld.

Uit deze proef, waarvan de resultaten zijn samengevat in tabel 12, blijkt dat sap zonder Na_2SO_3 bij 60 °C reeds inactief is, terwijl sap met Na_2SO_3 bij 60 °C nog niets van zijn virulentie heeft ingeboet.

Aangezien het Na_2SO_3 aan de bladeren vóór het uitpersen werd toegevoegd, kon in de proeven met en zonder Na_2SO_3 (No *31* en *35*) niet van gelijkwaardig sap worden uitgegaan. De uit te persen bladeren waren echter zo gekozen, dat de virulentie van het virus in beide groepen niet veel kon verschillen. De proeven *32*, *33*, *34* en *35* zijn een herhaling van proef *31*.

Behalve dat het sap soms van planten van andere chrysantenvariëteiten afkomstig was en de verhitting tot hoger temperaturen plaats vond, zijn deze proeven op dezelfde wijze uitgevoerd als proef *31*. In plaats van *Petunia hybrida nana compacta* „gemengd" werd *P. hybr. nana compacta* „Celestial" gebruikt. De resultaten van deze proeven zijn eveneens samengevat in tabel 12.

TABEL 12. Totaal aantal gele vlekken op telkens 5 planten Petunia hybr. nana compacta, veroorzaakt door sap met virus b, verhit tot verschillende temperaturen
Total number of yellow spots on 5 plants of Petunia hybrida nana compacta, caused by sap containing virus b, heated to different temperatures

Proef *Exper.*	Datum *Date*		Onverhit *Unheated*	Temperatuur in °C (10 minuten) *Temperature in °C (10 minutes)*						
				30	40	50	60	70	80	90
31	9-4-'51	Perssap . . . . *Sap*	14	13	7	6	0	–	–	–
		Perssap + 1 g Na_2SO_3 100 cm³ . . . . *Sap + 1 g Na_2SO_3 per 100 ml*	19	19	48	33	38	–	–	–
32	2- 8-'51	Perssap + 1 g Na_2SO_3 p. 100 cm³ . . . . . . *Sap + 1 g Na_2SO_3 per 100 ml*	39	42	59	41	8	0	0	0
33	27-12-'51	Perssap . . . . *Sap*	24	–	–	4	1	0	0	–
34	25- 1-'52	Perssap + 1 g Na_2SO_3 p. 100 cm³ . . . . . . *Sap + 1 g Na_2SO_3 per 100 ml*	39	50	86	103	182	7	0	–
35	27- 2-'52	Perssap . . . . *Sap*	173	83	64	8	31	3	0	–
		Perssap + 1 g Na_2SO_3 p. 100 cm³ . . . . . . *Sap + 1 g Na_2SO_3 per 100 ml*	339	357	530	369	168	26	0	–

Uit deze proeven blijkt, dat *virus b*-houdend perssap in 3 gevallen (proef *34* en *35*) tussen 70 en 80°C, in 2 (3?) gevallen (proef *31*, *32* en *33*) tussen 60 en 70°C en in 1 geval (proef *31*) reeds tussen 50 en 60°C werd geïnactiveerd. Het aantal gele vlekken op *Petunia*-bladeren bij perssap met Na_2SO_3 is belangrijk hoger dan bij perssap zonder Na_2SO_3, welk verschil nog duidelijker wordt bij verwarming van het sap; Neemt de virulentie van het perssap zonder bijvoeging reeds af bij verwarmen tot 30 en 40°C, perssap met Na_2SO_3 neemt bij deze temperaturen in virulentie toe, totdat bij 60 of 70°C een plotselinge daling optreedt.

Of het reductievermogen van Na_2SO_3 deze verhoogde virulentie te weeg brengt, kan pas blijken na verder onderzoek, b.v. met andere reducerende stoffen.

Gezegd kan worden dat de temperatuursgrens van het perssap in de wintermaanden tussen 70 en 80°C lag; in de voorjaars- en zomermaanden werd het virus in het toch al niet sterk infectieuze sap reeds tussen 50 en 70°C geïnactiveerd.

c. *Inactivering bij bewaren*

Een proef ter bepaling van de tijd dat het virus bewaard kon worden zonder dat de virulentie van virus b verdween, mislukte door het geringe infectievermogen van het toen gebruikte sap.

Uit de practijk bleek mij, speciaal bij de zuivering, dat *virus b* binnen een bewaartijd van 24 uur bij 0°C op *Petunia* nog een sterke reactie gaf.

Het onderzoek zal in een gunstiger seizoen worden voortgezet.

D. Zuivering van virus b

Met hetzelfde doel en op dezelfde wijze als voor *Cucumis virus 1 st. Chr.* is beschreven, werd enige malen geprobeerd ook *virus b* te zuiveren.

Het zuiveren van *virus b* is met deze methode niet gelukt, zoals blijkt uit proef *36* en *37*. Daarom werd in proef *41* bij het precipiteren, ammoniumsulfaat, dat blijkbaar het virus inactiveerde, vervangen door alcohol. Op deze wijze kon in proef *41 virus b* inderdaad gezuiverd worden.

Daar gebleken was dat uitpersen van bladeren met *virus b*, onder toevoeging van 1 g Natriumsulfiet ($Na_2SO_37H_2O$) p. 100 g blad, dikwijls een belangrijk sterker reactie op *Petunia hybrida* als toetsplant gaf, is bij de zuivering in vele gevallen vóór het uitpersen Natriumsulfiet toegevoegd; de gunstige invloed hiervan blijkt in deze onderstaande proeven echter niet steeds aanwijsbaar.

Proef *36* (8-1-'52). De zuiveringsmethode, zoals deze beschreven is op p. 152 werd toegepast met *virus b*-houdende chrysantenbladeren.

Sap vóór en na de eerste maal centrifugeren en het precipitaat dat na precipiteren met $(NH_4)_2SO_4$ weer was opgelost in water, werd geïnoculeerd op telkens 4 *Petunia*-planten. Het resultaat van deze proef ziet men in tabel 13.

Duidelijk blijkt uit deze tabel dat *virus b* na het centrifugeren in de bovenstaande vloeistof aanwezig bleef, maar dat het virus, na toevoegen van $(NH_4)_2SO_4$, geheel was geïnactiveerd.

Proef *37* (9-11-'51), op dezelfde wijze uitgevoerd als proef *36*, liet eveneens overtuigend zien dat het virus in het gezuiverde sap geïnactiveerd was, maar in het ruwe perssap niet.

Aan het resultaat van de volgende 3 op dezelfde wijze genomen proeven, *38 39* en *40* (29-5-'51, 2-8-'51 en 20-9-'51), is weinig waarde te hechten, daar het virus al in het onbehandelde sap een zeer gering infectievermogen bleek te bezitten. Van een bespreking zien wij dan ook af.

TABEL 13. Aantal gele vlekken op bladeren van Petunia hybr. nana compacta, geïnoculeerd met fracties van de zuivering van virus b
Number of yellow spots on leaves of Petunia hybr. nana compacta, inoculated with various fractions in the purification of virus b

Fracties van de zuivering *Fractions in the purification*	Aantal vlekken op 4 toetsplanten *Number of spots on 4 indicatorplants*
1. Perssap van chrysantenbladeren met virus b . . . . *Sap from leaves of chrysanthemum with virus b*	322
2. Heldere bovenstaande vloeistof na 1 uur centrifugeren bij 3000 toeren per min. van 1. . . . . *Clarified sap after 1 hour centrifuging at 3000 r. p. m. of 1.*	279
3. Precipitaat van een mengsel van 2. met $(NH4)_2SO_4$, 25 g p. 100 cm³, gecentrifugeerd en daarna opgenomen in water . . . . *Precipitate of a mixture of 2. with $(NH4)_2SO_4$, 25 g p. 100 ml., centrifuged and resuspended in water*	0
I Perssap van chrysantenbladeren met virus b, uitgeperst met Na_2SO_3, 1 g per 100 g. blad . . . . *Sap from leaves of chrysanthemum with virus b, with Na_2SO_3, 1 g p. 100 g. of leaves*	46
II Heldere bovenstaande vloeistof na 1 uur centrifugeren bij 3000 toeren per min. van I . . . . *Clarified sap after 1 hour centrifuging at 3000 r. p. m. of I*	64
III Precipitaat van een mengsel van II met $(NH_4)_2SO_4$, 25 g per 100 cm³, gecentrifugeerd en daarna opgenomen in water . . . . *Precipitate after centrifuging of a mixture of II with $(NH_4)_2SO_4$, 25 g p. 100 ml., centrifuged and resuspended in water*	0

Proef *41* (19-2-'52). De zuivering in proef *36* en *37* mislukte doordat *virus b* bij toevoeging van $(NH_4)_2SO_4$ werd geïnactiveerd.

In proef *41* is de juistheid van deze waarneming nogmaals aangetoond, terwijl daarnaast getracht werd het neerslaan, in plaats van met $(NH_4)_2SO_4$, met alcohol tot stand te brengen.

Het uitpersen van de chrysantenbladeren met *virus b*, het bevriezen en centrifugeren werd uitgevoerd zoals beschreven op p. 152. Vóór het uitpersen werd meestal Na_2SO_3 toegevoegd in een eindconcentratie van 1%. De bovenstaande vloeistof werd, na het respectievelijk toevoegen van alcohol en $(NH_4)_2SO_4$, 6 uur bij 0°C bewaard, vervolgens afgecentrifugeerd, waarna het precipitaat weer in iets water werd opgenomen. Alle fracties (tussentijds bewaard bij 0°C) werden tegelijkertijd, 11 uur na het uitpersen van het sap, geïnoculeerd op telkens 5 *Petunia*-planten. De fracties die met $(NH_4)_2SO_4$ waren neergeslagen, zijn echter pas na 10 uur dialyseren in water geïnoculeerd, dus 24 uur na het uitpersen van het sap.

De bovenstaande vloeistof van het gecentrifugeerde sap, dat behandeld was met alcohol (tabel 14: 3, 4 en 5), werd in verdunde toestand op de toetsplanten gewreven om te voorkomen dat de planten door de alcohol beschadigd zouden worden. Ter vergelijking werd ook de bovenstaande vloeistof zonder alcohol, in een verdunning van 1:3 geïnoculeerd op *Petunia*.

Een overzicht van deze proef geeft tabel 14.

Uit tabel 14 ziet men, dat bij toevoeging van alcohol met een eindconcentratie van 10% en 20%, in de bovenstaande vloeistof nog virus aanwezig was, maar dat

TABEL 14. Totaal aantal gele vlekken op geïnoculeerde bladeren van telkens 5 planten van Petunia hybrida nana compacta, geinoculeerd met op verschillende wijzen behandelde fracties van chrysantensap met virus b
Total number of yellow spots on inoculated leaves of groups of 5 plants of Petunia hybrida nana compacta, inoculated with fractions of sap from chrysanthemum with virus b, treated in different ways

Fracties van de zuivering *Fractions in the purification*	Aantal vlekken op 5 Petunia planten *Number of spots on 5 Petunia plants*
1. Bovenst. vloeistof, na bevriezen en centrifugeren (gedurende 100 min. bij 3000 toeren per min.) van het Chrysantensap . . . *Clarified sap, after freezing and centrifuging (for 100 minutes at 3000 r. p. m.)*	95
2. Bovenst. vloeistof als 1., verdund 1 : 3 . . . . *Clarified sap as 1., diluted 1 : 3*	106
3. 1 dl van 1. + 1 dl alcohol 20%, bovenst. vloeistof verdund 1 : 3 *1 part of 1. + 1 part alcohol 20%, clarified liquid diluted 1 : 3*	136
4. 1 dl van 1. + 1 dl alcohol 40%, bovenst. vloeistof verdund 1 : 6 *1 part of 1. + 1 part alcohol 40%, clarified liquid diluted 1 : 6*	89
5. 1 dl van 1. + 1 dl alcohol 60%, bovenst. vloeistof verdund 1 : 12 *1 part of 1. + 1 part alcohol 60%, clarified liquid diluted 1 : 12*	1
6. Precipitaat na centrifugeren van 1 dl van 1. + 1 dl alcohol 40%, opgenomen in oorspr. hoeveelheid water . . . . *Precipitate after centrifuging 1 part of 1. + 1 part alcohol 40%, suspended in original quantity of water .*	82
7. Precipitaat na centrifugeren van 1 dl van 1. + 1 dl alcohol 60%, opgenomen in oorspr. hoeveelheid water . . . . *Precipitate after centrifuging 1 part of 1. + 1 part alcohol 60%, suspended in original quantity of water*	273
8. Precipitaat na centrifugeren van 2 cm³ van 1. + 200 mg $(NH_4)_2SO_4$, in iets water opgenomen en 10 uur gedialyseerd . . *Precipitate after centrifuging of 2 ml. of 1. + 200 mg. $(NH_4)_2SO_4$, suspended in a little water and dialysed for 10 hrs*	18
9. Precipitaat na centrifugeren van 2 cm³ van 1. + 400 mg $(NH_4)_2SO_4$, in iets water opgenomen en 10 uur gedialyseerd . . *Precipitate after centrifuging of 2 ml. of 1. + 400 mg. $(NH_4)_2SO_4$, suspended in a little water and dialysed for 10 hrs*	0
10. Perssap 24 uur bewaard bij 0 °C, op dezelfde tijd als 8. en 9. geïnoculeerd . . . . *Sap kept at 0 °C for 24 hrs, inoculated at the same time as 8. and 9.*	60

bij toevoeging van alcohol met een eindconcentratie van 30% practisch alle virus uit de bovenstaande vloeistof was verdwenen. Blijkbaar is het virus na toevoeging van alcohol met een eindconcentratie van 30% in het precipitaat terecht gekomen, daar dit, weer opgenomen in water, een duidelijke reactie op *Petunia* gaf. Deze reactie was aanzienlijk sterker dan die, welke het gelijk behandelde precipitaat van de vloeistof met alcohol in een eindconcentratie van 20% gaf. We zijn geneigd te concluderen, dat naarmate het virus meer uit de bovenstaande vloeistof verdwijnt het in steeds groter hoeveelheid en nog geheel actief in het precipitaat terecht komt.

Het precipitaat, dat uit de heldere bovenstaande vloeistof, gemengd met 200 mg $(NH_4)_2SO_4$ (10%), na centrifugeren is neergeslagen, heeft in belangrijke mate aan virus-activiteit ingeboet, terwijl na menging met 400 mg $(NH_4)_2SO_4$ (20%) het virus in het precipitaat volledig is geïnactiveerd.

Twee proeven, *42* en *43* (12-3-'52 en 21-4-'52), waarbij nogmaals geprobeerd

werd *virus b* te zuiveren, mislukten. De bovenstaande vloeistof, na het centrifugeren van het ruwe sap, gaf op *Petunia* al geen reactie meer.

E. Gegevens van virus b verkregen met electronenmicroscopie

Tegelijkertijd met het electronenmicroscopisch onderzoek van *Cucumis virus 1 st. Chr.* is ook *virus b* onderzocht. Wat inleiding en methoden betreft kan verwezen worden naar p. 154; Slechts de wijze van zuivering volgens methode 1, werd enigszins anders uitgevoerd, namelijk door precipitatie met alcohol in plaats van ammoniumsulfaat (zie p. 173 e.v.).

De preparaten zijn uitsluitend van sap van chrysanten met *virus b* gemaakt, waarbij gezond chrysantensap als contrôle diende. In totaal werden van *virus b*-houdend sap 20 preparaten vervaardigd, terwijl van 3 van deze preparaten foto's werden genomen.

In de met alcohol gedeeltelijk gezuiverde preparaten (23-4-'52), waren staafvormige deeltjes te onderscheiden en wel in geringe hoeveelheid. Daar het gezuiverde sap op toetsplanten geen verschijnselen gaf, was blijkbaar de zuivering slecht gelukt en kon in de preparaten dan ook geen groot aantal virusdeeltjes verwacht worden.

In de preparaten gemaakt met sap dat 100 minuten bij 3000 toeren p. min. was gecentrifugeerd, werden (6-8-'52) geen deeltjes gevonden die als het virus beschouwd zouden kunnen worden.

In de preparaten die (6-8-'52) met de druppelmethode (methode 3) werden gemaakt, waren weer enkele staafvormige deeltjes te vinden.

Het lijkt waarschijnlijk dat deze waargenomen staafvormige deeltjes, die een afmeting hadden van ongeveer 600 × 30 mμ en in de preparaten van de gezonde chrysanten ontbraken, het beeld zijn van *virus b*. Ook hier zal, evenals bij het *Cucumis virus 1 st. Chr.*, verder onderzoek meer zekerheid moeten verschaffen.

F. Serologie van virus b

Door van der Want te Wageningen werd een antiserum verkregen na inspuiting van een konijn met *virus b*-houdend chrysantensap. De gebruikte methode was dezelfde als die bij het bereiden van een antiserum van *Cucumis virus 1 st. Chr.* werd toegepast (zie p. 156).

Op dezelfde wijze als voor *Cucumis virus 1 st. Chr.* (zie p. 156 e.v.) is door mij onderzocht of met dit antiserum *virus b* was aan te tonen. Dat dit mogelijk was kan blijken uit het volgende:

Met onverzadigd antiserum gaf sap van *virus b*-zieke chrysantenbladeren een duidelijk positieve precipitatiereactie, nog tot in een antiserumverdunning van 1:32. Met onverzadigd antiserum gaf gezond sap nog een reactie bij een verdunning van het antiserum van 1:8.

Met verzadigd antiserum precipiteerde ziek sap tot een antiserumverdunning van 1:32. Een verzadiging van het antiserum met 7 delen gezond sap bleek voldoende om in de contrôles met gezond sap geen vlokkingen meer te doen ontstaan. Bij een verzadiging van het antiserum van 1:3 echter, waren de ongewenste antilichamen blijkbaar nog niet uit het antiserum verdwenen.

Door het optreden van spontane vlokkingen of het zonder meer achterwege blijven van een reactie, was (evenals bij *Cucumis virus 1 st. Chr.*) het niet steeds mogelijk de gewenste resultaten te verkrijgen.

VI. STUNTVIRUS

Zoals in het literatuuroverzicht werd uiteengezet (p. 129), is de laatste jaren in de Ver. Staten van Amerika veel aandacht besteed aan een virusziekte in chrysanten „*stunt*" genaamd. Daar deze ziekte stellig ook in Nederland verwacht kon worden en een vergelijking van deze ziekte met de reeds in Nederland aangetroffen virusziekten nuttig kon zijn, werd met dit virus ook enig onderzoek verricht.

Door PH. BRIERLEY (Beltsville, Maryland, Ver. St. v. Amerika) werd mij, op mijn verzoek, door stunt aangetast chrysantenmateriaal verschaft[1]). De ontvangen gezonde en door *stuntvirus* aangetaste stekken van *Chrysanthemum indicum* Mary Mac Arthur en Mistletoe, werden verder gekweekt en met elkaar vergeleken.

Groeiremmingen, bij Mistletoe, gele vlekken op de bladeren, zoals in de literatuur wordt beschreven (zie literatuuroverzicht p. 129), konden bij de zieke planten worden waargenomen. Daar de ziekteverschijnselen van stunt moeilijk zijn te identificeren (op grond van groeiremming alleen is niet met zekerheid tot aanwezigheid van stunt te besluiten) is in het volgend onderzoek door mij gezocht naar een geschikte toetsmethode, daarbij gebruik makend van ervaringen die door onderzoekers al eerder bij dergelijk onderzoek zijn opgedaan, BRIERLEY & SMITH (1951 a).

Twee methoden van onderzoek zijn gevolgd, n.l. sapinoculatie en enting.

A. SAPINOCULATIE OP TOETSPLANTEN

Parallel met het testen van plantensoorten door sapinoculatie met *Cucumis virus 1 st. Chr.* en *virus b*, zijn op dezelfde wijze als beschreven is op p. 132 inoculaties uitgevoerd met sap van de bovengenoemde chrysanten, die door stunt waren aangetast.

Op geen der getoetste planten, die hieronder worden genoemd, zijn echter ziekteverschijnselen waargenomen:

Adonis aestivalis, *Ageratum mexicanum*, *Antirrhinum maximum*, *Calendula officinalis*, *Calliopsis lanceolata*, *Chrysanthemum carinatum*, *C. indicum* (zaailingen), *C. leucanthemum*, *C. segetum*, *Doronicum caucasicum*, *Gaillardia grandiflora*, *Helianthus annuus*, *Helichrysum bracteatum*, *Iberis coronata*, *Matricaria eximia*, *Nicotiana tabacum*, *N. glutinosa*, *Papaver nudicaule*, *Petunia hybrida*, *Senecio cruentus*, *Tagetes patula*, *Tropaeolum majus* en *Zinnia elegans*.

Daar *Senecio cruentus* (Cineraria) in de literatuur geschikt genoemd werd om als toetsplant gebruikt te worden, BRIERLEY (1950) (later spreken BRIERLEY & SMITH (1951 a) deze mededeling weer tegen), zijn met verschillende variëteiten van deze plant talrijke proeven gedaan. In totaal werden 150 planten geïnoculeerd, maar slechts éénmaal werd groeiremming en nerfnecrose waargenomen; aangezien deze verschijnselen naderhand nooit meer optraden, kan deze reactie moeilijk als typisch voor het *stuntvirus* beschouwd worden.

[1]) I am much indebted to MR PH. BRIERLEY for sending me this plant-material.

Dat het niet eenvoudig is een toetsplant voor *stuntvirus* te vinden blijkt ook uit het onderzoek van Keller (1950); geen van de 90 door hem onderzochte plantensoorten vertoonde een reactie na sapinoculatie met *stuntvirus*.

B. Entingen met chrysanthemum indicum variëteiten

Aangezien geen toetsplant gevonden werd, waarop het *stuntvirus* aangetoond kon worden, is een andere weg ingeslagen om te trachten het *stuntvirus* te identificeren. Hiertoe zijn entingen verricht met de chrysantenvariëteit Blazing Gold, waarmee volgens Brierley & Smith (1951 [a]) *stuntvirus* is aan te tonen. Wordt volgens deze auteurs op een gezonde plant van Blazing Gold met behulp van spleetenting een stunt-zieke ent gezet, dan vertonen de naderhand uitlopende scheuten van deze plant, 6 weken na de enting, lichtbegrensde nerven en een naar beneden omkrullen der bladranden.

Na spleetenting van stunt-zieke Mary Mac Arthur op Blazing Gold, werden 5 weken later inderdaad de verschijnselen bij Blazing Gold waargenomen, die Brierley & Smith beschrijven, terwijl daarentegen bij enting van gezonde Mary Mac Arthur, de bladeren van Blazing Gold normaal van kleur en vorm bleven.

Met deze methode werd nu bij een aantal viruszieke chrysanten, die indertijd niet door *Cucumis virus 1 st. Chr.* of *virus b* bleken aangetast te zijn, stunt geconstateerd. (Clara Holford, Indianapolis Yellow en Pink Long Island Beauty).

De vraag rees of de Blazing Gold-entmethode ook bruikbaar is om *stuntvirus* aan te tonen, wanneer in de te onderzoeken plant ook nog andere viren aanwezig zijn. Ter beantwoording van deze vraag zijn op 35 Blazing Gold onderstammen enten gezet van chrysanten bij welke door inoculatie op toetsplanten was vastgesteld dat *Cucumis virus 1 st. Chr.* of *virus b* aanwezig was. Bij de uitgroeiende Blazing Gold scheuten waren de verschijnselen zeer verschillend. Na 1 tot 2 maanden waren soms lichtbegrensde nerven te zien, soms trad een mozaïek op, meestentijds zwak, maar toch ook wel eens zeer duidelijk en dan gepaard gaande met enige necrose. Soms waren in het geheel geen verschijnselen aanwezig.

Deze zo sterk uiteenlopende beelden maken het voorlopig niet mogelijk om met de Blazing Gold-entmethode *stuntvirus* aan te tonen in planten, die reeds door *Cucumis virus 1 st. Chr.* of *virus b* zijn aangetast.

VII. VIRUS C

In één plant van de chrysantenvariëteit *Samaria* trad een ziektebeeld op van mozaïek en kringen op de bladeren en enigszins verfrommelde bloemlinten, dat veroorzaakt werd door een virus dat in zijn reactie op toetsplanten afweek van *Cucumis virus 1 st. Chr.* en *virus b.*

Op de geïnoculeerde bladeren van *Petunia hybrida nana compacta* „Celestial" werden 2 weken na de sapinoculatie necrotische vlekjes en zeer karakteristieke ringen zichtbaar, die dikwijls concentrisch waren. Ook in de volgende weken ontstonden nog nieuwe ringen. Op de niet geïnoculeerde bladeren ontstonden geelwitte lijntjes, die dikwijls ringen vormden, maar vaak ook grillig en scherphoekig gerangschikt waren.

Ook op *Nicotiana glutinosa* en *N. tabacum* ontstond een reactie op geïnoculeerde bladeren, die echter weinig typisch was en veel minder sprekend dan bij *Petunia.*

Verder onderzoek werd met deze ziekte niet verricht, zodat het niet mogelijk is met deze karige gegevens het virus te identificeren.

VIII. LYCOPERSICUM VIRUS 3 (TOMATO SPOTTED WILTVIRUS)

Het wekt bevreemding dat *Lycopersicum virus 3* in Nederland nooit op chrysanten werd aangetroffen, terwijl bijvoorbeeld in Engeland de chrysant als een belangrijke waardplant van dit virus beschouwd wordt. Wel komt dit virus in Nederland op vele andere gewassen voor. De in de literatuur genoemde karakteristieke kenmerken op de bladeren (zie literatuuroverzicht p. 127) zoals ringen en lijnen, werden door mij nooit waargenomen, en bronskleur en necrose die wel een enkele keer werden geconstateerd, bleken niet door *Lycopersicum virus 3* veroorzaakt te zijn.

De mogelijkheid bleef bestaan, dat het virus wel voorkwam, maar door omstandigheden op toetsplanten geen reactie wilde veroorzaken, een verschijnsel waarop AINSWORTH (1936) gewezen heeft.

Om meer inzicht te krijgen in de verschijnselen die *Lycopersicum virus 3* op chrysanten veroorzaakt en om na te gaan of dit virus inderdaad moeilijk op toetsplanten is over te brengen, zijn jonge planten van chrysanten-zaailingen en gestekte planten van bestaande variëteiten, in Januari 1952 geïnoculeerd met sap van *Nicotiana tabacum*, die na inoculatie met sap van *Campanula isophylla* verschijnselen van *Lycopersicum virus 3* vertoonde.

Slechts één van de 16 geïnoculeerde chrysanten liet duidelijk een reactie zien, namelijk op een geïnoculeerd blad, een bruine, necrotische ring. Op de niet geïnoculeerde bladeren werden geen verschijnselen waargenomen.

Niet geïnoculeerde bladeren van de enige chrysant die een reactie vertoonde, werden samen met Natriumsulfiet ($Na_2SO_3.7H_2O$) 1 : 100 uitgeperst en geïnoculeerd op 5 planten van *Petunia hybrida* en 5 van *Nicotiana tabacum*. Op 3 der *Petunia*-planten en op alle 5 planten van *Nicotiana tabacum* werd een zeer duidelijke reactie van *Lycopersicum virus 3* waargenomen. Twee van de 15 niet reagerende chrysantenplanten werden op dezelfde wijze als de viruszieke plant op hun reactie getoetst, waarbij bleek dat geen virus in deze planten aan te tonen was. Zie voor het ziektebeeld op deze toetsplanten NOORDAM (1952 b).

De duidelijke reactie, die met de ene chrysant op toetsplanten verkregen werd, bewijst dat het wel degelijk mogelijk is *Lycopersicum virus 3* uit chrysant op toetsplanten over te brengen en tevens dat, althans het *Lycopersicum virus 3* afkomstig uit *Campanula isophylla*, niet in de door mij onderzochte van nature zieke chrysanten voorkwam.

Een grondiger onderzoek, waarbij ook rekening gehouden moet worden met de mogelijkheid dat uiteenlopende stammen van *Lycopersicum virus* 3 zouden kunnen voorkomen, zal wellicht kunnen aantonen, waarom dit virus nooit werd aangetroffen.

IX. CONCLUSIES VOOR DE PRACTIJK VAN DE TUINBOUW

In dit onderzoek kon worden aangetoond dat zeer veel chrysantenplanten met groeiremming (Fig. 23), vlekkerige bladeren, miskleurige en verfrommelde bloemen (Fig. 1–19) door virusziekten zijn aangetast. Doordat iedere plant afzonderlijk was gemerkt, kon vastgesteld worden dat planten met slechte, virus-zieke bloemen altijd een nakomelingschap gaven van dezelfde slechte kwaliteit. Het aanhouden van planten als moerplant, waarin men virusziekte heeft geconstateerd, is steeds zeer sterk af te raden en speciaal in de stekhandel niet te verantwoorden, daar de afnemer de slechte kwaliteit van het stek vrijwel nooit kan vaststellen.

Nu is het vaak moeilijk om viruszieke planten te herkennen. Vele zieke planten zijn slechts bij zeer scherpe waarneming van gezonde te onderscheiden. In dergelijke twijfelgevallen is het mogelijk gebleken binnen 2–6 weken uit te maken of een plant ziek is of niet, door sap van de verdachte plant op andere plantensoorten (toetsplanten) over te brengen. Bovendien kan door middel van een serologische methode voor 2 van de 3 belangrijkste viren in één dag worden aangetoond dat een chrysant virusziek is, al moet deze methode voor geregelde toepassing nog verder worden uitgewerkt. Met het derde belangrijke virus (Stunt) werd nog geen serologisch onderzoek verricht.

Dit aantonen van virusziekte in een plant, volgens de beide bovengenoemde methoden, is zeer tijdrovend en kan daarom in de toekomst alleen toegepast worden, indien de zekerheid bestaat dat de kweker alles in het werk stelt om zijn chrysanten zo gezond mogelijk te krijgen.

Hij zal in *de eerste plaats* geen planten die tijdens groei of bloei ziekteverschijnselen vertonen of vertoond hebben, als moerplanten mogen gebruiken. Want indien van een zieke moerplant stekken worden genomen, zullen deze stekken, ook al zien ze er nog zo mooi uit, naderhand tot planten met waardeloze bloemen uitgroeien.

Ten tweede zal hij rekening moeten houden met het feit, dat de virusziekten, die reeds in zijn gewas aanwezig zijn, door overbrenging van sap, d.w.z. door aanraking met de hand op gezond materiaal kunnen worden verspreid.

Daar voor een van de meest voorkomende viren overbrenging door bladluizen werd aangetoond, is het *in de derde plaats* gewenst het gewas zoveel mogelijk luisvrij te houden.

Hoewel in de practijk van de tuinbouw in Nederland het geval nog niet bekend is, dat chrysanten door andere viruszieke plantensoorten werden besmet, willen wij toch op de mogelijkheid wijzen dat uit andere cultures, de virusziekten op het chrysantengewas zouden kunnen overgaan. In dit onderzoek zijn namelijk talrijke plantensoorten genoemd, die door chrysantenviren kunnen worden aangetast. Omgekeerd zou het ook mogelijk kunnen zijn dat een ziek chrysantengewas planten van een andere cultuur besmet.

Het is hier niet de plaats een gedetailleerde opsomming te geven van de maatregelen die de kweker dient te nemen om de virusziekten zo effectief mogelijk te bestrijden. De ervaring bij anjers heeft geleerd dat op geen manier een zó in-

tensieve bestrijding van ziekten met een zó duidelijk zichtbaar resultaat wordt verkregen, als door het werk van een keuringsdienst. Deze keuringsdienst geeft voorlichting, hoe en in welke tijd van het jaar de virusziekten het beste zijn te herkennen en te bestrijden, en voorkomt ook dat de kweker minderwaardig plantgoed aanschaft.

Een dergelijke keuringsdienst voor chrysanten zou de schade door virusziekten aan de chrysantenteelt te weeg gebracht mijns inziens op de snelste manier kunnen beperken.

SUMMARY

Virus diseases of chrysanthemum indicum in the Netherlands

Since 1945 there has been a serious increase in virus diseases of *Chrysanthemum indicum* in the Netherlands; this is attributed to the importation of new varieties from England and, to a lesser degree, from the United States of America.

The symptoms of nearly 400 virus-diseased plants, belonging to 116 varieties, were studied. At the same time indicator plants were used to determine which viruses were present in these diseased plants (p. 140, 168). Two viruses were found to occur very frequently, viz. a strain of *Cucumis virus 1* [1]), here called *Cucumis virus 1 st.* (*rain*) *Chr.* (*ysanthemum*), and an unknown virus that has been referred to as *virus b*. Besides these, *stunt virus* was also found, though much less frequently; a fourth virus, referred to as *virus c*, was found in one chrysanthemum only.

The symptoms caused by the viruses on certain varieties are described (p. 133).

Chrysanthemums affected with *Cucumis virus 1 st. Chr.* always showed symptoms of disease. Varieties are mentioned (p. 137) which showed symptoms both in leaf and flower (1a); others which showed symptoms in the flower only (1b) and a number which showed symptoms on the leaves, but whose flowers were not examined (1c).

Virus b was found in chrysanthemums, both with and without symptoms (p 137). A number of varieties showed abnormalities in leaf and flower (2a); others showed abnormalities in the flower only, not in the leaf (2b); others again showed abnormalities in the leaf, but not in the flower (2c); whereas a number showed no symptoms at all (2d). In the variety Miss Wilcox, plants occurred with reddish-brown, yellow-striped and yellow flowers, all of which were infected with *virus b;* since the progenies of these 3 colour-forms remained constant, it is suggested that there are different strains of *virus b*, differing in the intensity with which they affect the plants.

For some remarkable virus symptoms lists are given of the chrysanthemum varieties in which these symptoms were observed. After each variety in brackets is given whether *Cucumis virus 1 st. Chr.* (abbreviated: Cu.), *virus b* (abbreviated: b), or *stunt virus* (abbreviated: st.) was found, or whether the cause of the disease remained unknown (denoted as: ?) (p. 138).

These symptoms observed were stunting of the plant (1), mosaic mottling of the leaves (2a), circular patterns (2b), necrotic spots (2c), necrotic rings (2d), and malformation of the leaf (3). In chrysanthemums with red, bronze or brown flowers the colour of virus-diseased flowers was often partly or entirely yellow (4a); violet-red, light-red or pink flowers became white-spotted or entirely white (4b); yellow flowers seldom showed discolorations and white flowers never (4c, no varieties mentioned). Often the ligules were of unequal length (5).

[1]) Following the nomenclature in K. M. Smith: A textbook of plant virus diseases, 1937.

I. *Cucumis virus st. Chr.* could be transmitted by sap-inoculation to 16 out of 35 species of plants (p. 140 to p. 144). Of these, *Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum* and *Petunia hybrida nana compacta* could be used very well as indicator plants. A short description of the symptoms on *N. tabacum* (Fig. 22) and *N. glutinosa* Fig. 26) is also given in Table 9 (p. 163). The strain of the virus that occurs in chrysanthemum differs from the „type" of *Cucumis virus 1*, among other ways, in that it seldom causes a reaction on gherkin (at most a local reaction on the cotyledons), and because it causes severe malformation and narrowing of the leaves of *Nicotiana glutinosa* (Fig. 26) and *Petunia hybrida* (Fig. 24, for flower see fig. 25). The species of plants that showed no reaction are mentioned on p. 144.

Sap from tobacco leaves inoculated with *Cucumis virus 1 st. Chr.* still gave a reaction on *Nicotiana tabacum* at a dilution of 10^{-5} or 10^{-6} in the winter months, and of 10^{-3} to 10^{-4} at other times of the year (Table 1, p. 148).

It will be seen from Table 2 (Experiment 5, p. 149) that tobacco sap may be diluted ten times and still give as strong a reaction as chrysanthemum sap.

The sap was still infectious after heating for ten minutes at 65 °C, but not after heating at 70 °C (Table 3, p. 150). At 50 °C some inactivation took place (Table 4, p. 151).

Sap that was kept at 23 ° to 25 °C was sometimes still infectious after 12 hours; in other cases the virus has already lost its infectivity within 2 hours.

On two occasions centrifuging sap for 75 minutes at 3000 r.p.m. and then precipitating with ammonium sulphate (25 g per 100 ml) gave good results in purifying the virus, but this method failed on three other occasions. In two of the experiments it appeared that the purification failed because of sedimentation of the virus from the crude expressed sap during centrifugation.

Electron micrographs were made of expressed crude sap after purification or only centrifugation, as well as of bleeding sap (Johnson 1951). These electron micrographs revealed the presence of more or less round particles of different sizes (20–150 mμ). The bigger particles apparently are aggregated of smaller ones; the biggest particles are flattened (Fig. 27 and 28). This aggregation of particles can be held responsible for the sedimentation of the virus during centrifugation. The specimens of healthy sap revealed, in a much lesser number than the specimens of diseased sap, the presence of some more or less round particles of a diameter of 75 mμ at most.

With an antiserum prepared by Van der Want according to a method described by Beemster & Van der Want (1951), the presence of the virus could be demonstrated in diseased plants of *Nicotiana tabacum* and *Chrysanthemum indicum* by a microprecipitation reaction. Antiserum saturated with 3 or 7 parts of healthy sap still gave a reaction with diseased sap at a dilution of 1:32. Antiserum saturated with 1 part of healthy sap, precipitated with healthy sap occasionally, but never when saturated with 3 or 7 parts (Table 5, p 157). The reaction was not always reliable, for sometimes it was obscured by spontaneous precipitation and sometimes no reaction occurred (possibly in consequence of sedimentation during centrifugation).

By means of a micro-agglutinationreaction *Cucumis virus 1 st. Chr.* could be demonstrated in tobaccosap (Table 6, p. 159), but not in sap of *Chrysanthemum indicum*. At an end dilution of the saturated antiserum of 1:500 a positive reaction was still obtained. Also the yellow strain of *Cucumis virus 1*, No 6 of

Price, gave a positive agglutination reaction with the antiserum of *Cucumis virus 1 st. Chr.* (Table 7, p. 160), so that the two viruses proved to be serologically related.

Aphides of the species *Myzus persicae* were able to transmit the virus to healthy plants after only 2 minutes' feeding on a diseased plant (Table 8, p. 162).

By means of the premunity-principle (acquired immunity), also, the relationship was demonstrated between the virus of chrysanthemum and (1) the yellow strain of *Cucumis virus 1*, No 6 of Price, and (2) gherkin mosaic virus, a strain of *Cucumis virus 1*. The symptoms of these 3 viruses on *Nicotiana glutinosa* (Fig. 26) and *N. tabacum* are given in Table 9 (p. 163). As a rule, the 3 viruses protected the plants against a later infection with any of these viruses (Tables 10 and 11, p. 164 and 165).

Because of the cross-protection (premunity), together with the serological „relationship reaction" and the similarity between the symptoms of the chrysanthemum virus and those of *Cucumis virus 1* on certain indicator plants, the chrysanthemum virus under discussion may be taken for *Cucumis virus 1* – though because of different reactions on a few indicator plants it may be best to regard it as a distinct strain. The *Cucumis virus 1 st, Chr.* differs from the aspermy virus, as described in literature, in this respect that the aspermy virus fails to protect against strains of *Cucumis virus 1*, Blencowe & Caldwell (1949), Brierley & Smith (1951 b).

That the *Cucumis virus 1 st Chr.* may be held responsible for the origin of discoloured and crumpled flowers such as they occur in the naturally diseased plants, was proved by sap inoculation on some chrysanthemum varieties (Prélude and Royal Bronze, figs. 12 and 23).

Since the plants used for this experiment already contained *virus b* (without showing symptoms on the leaves of the flowers, figs. 13 and 23 on the left) it is, however, not impossible that the symptoms observed, only appear in the presence of the complex *Cucumis virus 1 st. Chr.* and *virus b*.

II. *Virus b*. Seven out of 31 plants pecies gave a reaction after sap-inoculation with *virus b* (p. 168) *Petunia hybrida nana compacta* appeared to be a useful indicatorplant (local reaction 3 weeks after sap inoculation, figs. 20 and 21) provided *Cucumis virus 1 st. Chr.* was not also present in the plant to be tested. The local reaction on *Helichrysum bracteatum monstrosum* is typical (Fig. 29, p. 169), but it often fails to develop. Exeptionally a faint local reaction was found on *Nicotiana glutinosa*. Transmission of the virus to *Nicotiana tabacum* always failed. The plant species listed on p. 170 gave no reaction.

The dilution end-point and the inactivation of the virus by ageing were tested in summer only; because of the low infectivity of the virus at this season of the year, they could not be determined very well.

The virus was inactivated by heating for 10 minutes between 70 ° and 80 °C in the winter months; at other times of the year, however, it was inactivated between 50 ° and 70 °C (Table 12, p 172). The infectivity of expressed sap heated with Na_2SO_3 increased, until a sudden fall occurred at 60 ° or 70 °C.

Purification of *virus b* by centrifuging and precipitation with ammonium sulphate proved to be impossible (Table 13, p. 174); it was sometimes possible, however, when alcohol instead of ammonium sulphate was used (Table 14, p. 175).

The presence of *virus b* in diseased chrysanthemums could be demonstrated

by means of the precipitin reaction. The antiserum was prepared by VAN DER WANT. Diseased sap gave a positive precipitation-reaction with antiserum saturated with 7 parts of chrysanthemum sap. A positive result could be obtained even with antiserum diluted 1:32.

Using the electron microscope, rod-shaped particles of about 600×30 mμ (not present in healthy sap) were found, which may be considered as possibly being the *virus b*-particles.

III. *Stunt*. The most typical symptoms of stunt disease were stunting of the plant and sometimes light-green or yellowish spots on the leaves (Fig. 16). Stunt virus, inoculated by means of sap on 23 plant species, failed to give any reaction (p. 177). Stunt could be demonstrated in the varieties Clara Holford, Indianapolis Yellow and Pink Long Island Beauty by grafting a diseased scion of these varieties on to the healthy chrysanthemum variety Blazing Gold (method of BRIERLEY and SMITH 1951 a). If *Cucumis virus 1 st. Chr.* and *virus b* were also present in the diseased plant, this method could not be used.

IV. *Virus c* (an unknown virus), which was found in one plant only, could be transmitted to *Petunia*, among other plant species. Two weeks after inoculation circular spots appeared on the leaves. This virus has been insufficiently tested as yet.

Lycopersicum virus 3 [1]) (tomato spotted wilt) has not yet been found on chrysanthemum in Holland, but could be transmitted to chrysanthemum.

---

[1]) Following the nomenclature in K. M. SMITH: A textbook of plant virus diseases, 1937.

GERAADPLEEGDE LITERATUUR

AINSWORTH, G. C. – 1933. Spotted wilt of tomatoes. Rep. Exp. Sta. 1932: 39–42.
——— 1936. Detection of spotted wilt in chrysanthemums. Nature 137: 868.
——— 1937. Virus diseases, ornamental plants. Rep. Exp. Res. Sta., Cheshunt. 1936: 60–62.
——— 1938. A note on certain viruses of the cucumber virus 1 type isolated from monocotyledonous plants. Ann. appl. Biol. 25: 867–869.
——— 1939. Virus diseases, Chrysanthemum. Rep. Exp. Res. Sta. Cheshunt. 1938: 60.
ALGERA, L., T. H. THUNG & J. P. H. VAN DER WANT – 1947. Over het zuiveren van plantenviren. T. Pl.ziekten 53: 133–139.
ANDERSON, C. W. – 1951a. Some preliminary observations on cucurbit viruses in Florida. Plant Dis. Rep. 35: 233–234.
——— 1951b. Further observations of some cucurbit viruses from central Florida. Plant Dis. Rep. 35: 396–398.
ANONYMUS – 1948. Big bud disease of tomatoes. Gard. Chron. 123: 205.
ANONYMUS–1949. Plant diseases, spotted wilt of ornamental plants. J. Dep. Agr. Vict. Australia 47: 230–232.
ANONYMUS–1951a. Signs of chrysanthemum virus. The Grower 36: 1190–1191.
ANONYMUS–1951b. In: Nachr. Bl. dtsch. Pflanzenschutzdienst. 3: 157.
BAKER, K. F., L. H. CLARK & M. H. KIMBALL–1949. Association of Deuterophoma spp. with a chrysanthemum stunt disease in California. Plant. Dis. Rep. 33: 2–8.
BALD, J. G. & G. SAMUEL – 1931. Investigations on spotted wilt of tomatoes II Council sci.a. industr. Res. Melbourne. Bul. 54: 1–24.
BAWDEN, F. C. – 1934. Studies on a virus causing foliar necrosis of the potato. Proc. Roy. Soc. Lond. B, 116: 375–395.
——— 1950. Plant viruses and virus diseases. Waltham. Mass. U.S.A.
BAWDEN, F. C. & H. L. NIXON – 1951. The application of electron microscopy to the study of plant viruses in unpurified plant extracts. J. gen. Microbiol. 5: 104–109.
BEEMSTER, A. B. R. & J. P. H. VAN DER WANT – 1951. Serological investigations on the Phaseolus viruses 1 and 2. Ant. Leeuwenhoek. 17: 285–296.
BEWLEY, W. F. & A. A. RICHARDS – 1951. Mosaic disease of the Chrysanthemum. Gard. Chron. 129: 20.
BHARGAVA, K. S. – 1951. Some properties of four strains of cucumber mosaic virus. Ann. appl. Biol. 38: 377–388.
BIRKELAND, J. M. – 1934. Serological studies of plant viruses. Bot. Gaz. 95: 419–436.
BLENCOWE, J. W. & J. CALDWELL – 1946. A new virus disease of tomatoes. Nature, Lond. 158: 96–97.
——— 1949. Aspermy, a new virus disease of the tomato. Ann appl. Biol. 36: 320–326.
BOOIJ, H. L., M. P. DE BRUYN OUBOTER, M. C. CREMER & E. VAN SLOGTEREN – 1944. Verslag van het serologisch onderzoek betreffende de vergelingsziekte der suikerbieten. Med. Inst. Rationele Suikerproductie Bergen op Zoom. 14: 1–28.
BRIERLEY, P. – 1950. Some host plants of chrysanthemum stunt virus. Abs. Phytopath. 40: 869.
BRIERLEY, P. & F. F. SMITH – 1949. Evidence points to virus as cause of chrysanthemum stunt. Flor. Rev. 103 (2676): 36–37.
——— 1951a. Chrysanthemum stunt. Flor. Rev. 107 (2778): 27–30.
——— 1951b. Survey of virus diseases of chrysanthemums. Plant. Dis. Rep. 35: 524–526.
BRUYN OUBOTER, M. P. DE, J. J. BEIJER & E. VAN SLOGTEREN – 1951. Diagnosis of plant diseases by electron microscopy. Ant. Leeuwenhoek (J. Microbiol. a. Serology) 17: 189–208.
CHAMBERLAIN, E. E. – 1939. Cucumber mosaic (Cucumis virus 1 of Smith 1937) New Zealand J. Sci. a. Techn. 21 (2A): 73A–90A.
CHESTER, K. S. – 1937. Serological studies of plant viruses. Phytopath. 27: 903–912.
DIMOCK, A. W. – 1947. Chrysanthemum stunt. New York St. Flow. Grow. Bull. 26: 2.
DOOLITTLE, S. P. – 1920. The mosaic disease of cucurbits. U.S. Dep. Agr. Washington Bull. 879: 1–69.

FAAN, H. C. & J. JOHNSON – 1951. Strains of the cucumber mosaic virus. Abs. Phytopath. 41: 11.
FULTON, J. P. – 1950. Studies on strains of cucumber virus 1 from spinach. Phytopath. 40: 729–736.
GARDNER, M. W. & O. C. WHIPPLE – 1934. Spotted wilt of tomatoes and its transmission by thrips. Abs. Phytopath. 24: 1136.
GIDDINGS, N. J. – 1938. Studies of selected strains of curly-top virus. J. Agr. Res. Washington. 56: 883–894.
——— 1940. Curly-top virus strains. Abs. Phytopath. 30: 786.
——— 1941. Strain combinations of curly-top virus. Abs. Phytopath. 31: 8.
GRANCINI, P. & F. CESARONI – 1950. Alcune osservazioni sul „fern leaf" del pomodoro in Italia. Notiz. Malatt. Piante (8): 53–57.
HARTER, L. L. – 1938. Mosaic of lima beans (Phaseolus lunatus macrocarpus). J. Agr. Res. Washington 56: 895–906.
HILL, A. V. – 1943. Insect transmission and host plants of virescence (Big bud of tomato). J. Council sci. a. industr. Res. (Aust.) 16: 85–90.
HOLMES, F. O. – 1934. A masked strain of tobacco-mosaic virus. Phytopath. 24: 845–873.
JOHNSON, E. M. & W. D. VALLEAU – 1935. Susceptibility of tobacco plants visibly affected with mild tobacco mosaic to other strains of the virus. Kentucky agr. Exp. Stat. Bull. 360: 192–201.
JOHNSON, J. – 1951. Virus particles in various plant species and tissues. Phytopath. 41: 78–93.
JONES, L. K. – 1942. Diseases of greenhouse plants. State College of Washington Agr. Exp. Stat. Pullman, 52 Am. Rep. Bull. 425: 73.
KELLER, J. R. – 1949. Chrysanthemum stunt, its nature and spread. Flor. Exch. 113(16): 58.
——— 1950. New virus complex of chrysanthemums. New York St. Flow. Grow. Bull. 62: 2–5.
KOHL, H. C., A. M. KOFRANEK, K. POST & F HORTON – 1950. No easy way out of chrysanthemum stunt. New York St. Flow. Grow. Bull. 57: 4–6.
KÖHLER, E. – 1935. Übertragungsversuche mit dem Virus der Lupinenbräune. Angew. Bot. 17: 277–286.
KUNKEL, L. O. – 1926. Studies on aster yellows. Am. J. Bot. 13: 646–705.
——— 1934. Studies on acquired immunity with tobacco and aucuba mosaics. Phytopath. 24: 437–466.
MIKKELSEN, J. – 1950. A practical method of elimination of chrysanthemum stunt. Ohio Flor. Bull. Febr.: 29–30.
NELSON, R. – 1925. Chrysanthemum yellows, a new disease in the greenhouse. Michigan agr. exp. Stat. quart. Bull. 7: 157–160.
NIENOW, J. – 1948. The identification and characterization of a virus causing mosaic in Mertensia virginica. Phytopath. 38: 62–69.
NOORDAM, D. – 1950. Chrysanten, virusziekte. Jaarversl. Proefstat. Bloem. Ned. Aalsmeer, 1949: 41–42.
——— 1951a. Chrysant, virusziekten. Jaarversl. Proefstat. Bloem. Ned. Aalsmeer, 1950: 24–25.
——— 1951b. Virusziekten in chrysanten. Vakbl. Bloem. 6: 298.
——— 1952 *a*. Chrysant, virusziekte. Jaarversl. Proefstat. Bloem. Ned. Aalsmeer, 1951: 29–30.
——— 1952 *b*. Lycopersicum virus 3 (Tomato spotted wilt) bij enkele bloemisterij gewassen. T. pl. ziekten 58: 89-96.
NOORDAM, D. & A. G. A. v. D. NES – 1949. Een en ander over virusziekten in chrysanten. Vakbl. Bloem. 4: 362.
OGILVIE, L. – 1934. Spotted wilt of tomatoes and its control. Ann. Rep. agr. hort. Res. Stat. Long Ashton, Bristol.: 170–174.
OLSON, C. J. – 1949. Possibilities of 100 per cent stunt free stock. Flor. Exch. 113 (20): 19, 32, 33.
POST, K. – 1948. Marginal lighting for identifying chrysanthemum stunt. New York St. Flow. Grow. Bull. 31: 3–5.
PRICE, W. C. – 1934. Isolation and study of some yellow strains of cucumber mosaic. Phytopath. 24: 743–761.
——— 1935a. Acquired immunity from cucumber mosaic in Zinnia. Phytopath. 25: 776–789.
——— 1935b. Classification of southern celery-mosaic virus. Phytopath. 25: 947–954.
——— 1937. Classification of lily-mosaic virus. Phytopath. 27: 561–569.
——— 1939. Cross protection tests with two strains of cucumber-mosaic virus. Phytopath. 29: 903–905.

——— 1940. Acquired immunity from plant virus diseases. Quart. Rev. Biol. 15: 338–361.
Pound, G. S. & J. C. Walker – 1948. Strains of cucumber mosaic virus pathogenic on crucifers. J. agr. Res. 77: 1–12.
Quanjer, H. M. – 1942. Phytopathologische terminologie, met speciale bespreking van de begrippen biotrophie, premuniteit en antistoffen. T.pl.ziekten 48: 1–16.
Salaman, R. N. – 1938. The potato virus X: its strains and reactions. Philos. Trans. Roy. Soc. Lond. B. 559: 137–217.
Selman, J. W. – 1940. A virus disease of Chrysanthemum. Rep. Exp. Sta. Cheshunt 1939: 36–37.
Severin, H. H. – 1934. Transmission of California aster and celery yellows virus bij three species of leafhoppers. Hilgardia 8: 339–361.
Sill, W. H., Jr., W. C. Burger, M. A. Stahmann & J. C. Walker – 1952. Electron microscopy of cucumber virus 1. Abs. Phytopath. 42: 19–20.
Smith, K. M. – 1935. Some diseases of ornamental plants. J. Roy. hort. Soc. 60: 304–310.
——— 1936. The virus diseases of glasshouse and garden plants. Sci. Hort. 5: 126–140.
——— 1937. A textbook of plant virus diseases. J. & A. Churchill, London.
——— 1946. Virus diseases of farm and garden crops. Littlebury & Co., Worcester.
——— 1949. Viruses and virus diseases. J. Roy. hort. Soc. 74: 482–491, 521–528.
——— 1951. Recent advances in the study of plant viruses. J. & A. Churchill, London.
——— 1952. Some garden plants susceptible to infection with the cucumber mosaic virus. J. Roy. hort. Soc. 70: 19–21.
Thung, T. H. – 1937. Smetstof en plantencel bij enkele virusziekten van de tabaksplant. III. T.pl.ziekten 43: 11–32.
——— 1938. Smetstof en plantencel bij enkele virusziekten van de tabaksplant. IV. T. pl.-ziekten 44: 225–246.
——— 1939. Smetstof en plantencel bij enkele virusziekten van de tabaksplant. V. T. pl.-ziekten 45: 247–259.
——— 1948. Waarnemingen over enkele plantenviren met het electronen-microscoop. Chronica Naturae 104: 344–348.
——— 1949. Grondbeginselen der plantenvirologie. H. Veenman & Zonen, Wageningen.
Tjallingii, F. – 1949. Virusziekten van komkommerachtige gewassen, in het bijzonder van augurken. Med. Dir. Tuinbouw 12: 584–593.
Weiss, F. – 1948. Check list revision. Plant. Dis. Rep. 32: 144–157.
Welsh, M. F. – 1948. Stunt-mottle virus disease of chrysanthemum. Sci. Agr. 28: 422.

VIRUSZIEKTEN BIJ CHRYSANTEN (CHRYSANTHEMUM INDICUM)

Virus diseases in Chrysanthemum indicum

Bij elke afbeelding is aangegeven welk virus in de betreffende plant werd aangetroffen, nl. Cucumis virus 1st. Chr. (afgekort Cu.), b of stunt.

At every picture is recorded what virus was found in the plant in question, namely Cucumis virus 1st. Chr. (abbreviated Cu.), b or stunt.

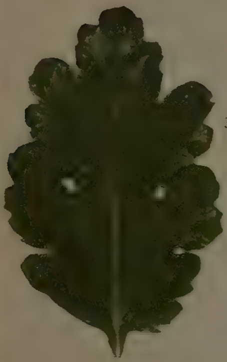
CRIMSON CROWN

1

2

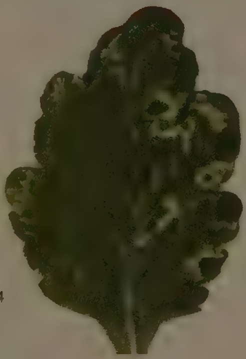
Normale bloem van gezonde plant
Normal flower of healthy plant

Virus Cu., bloem gee.gestreept
flower yellow-striped

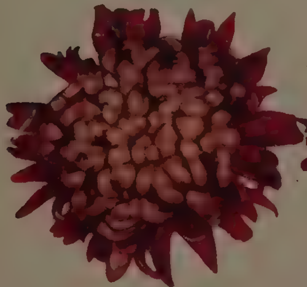

3

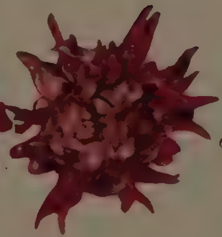
Virus Cu. op/*on* SMILES
gele strepen vooral
langs de bladrand
yellow streaks, especially near the margin of the leaf

Virus Cu. op/*on* SMILES
geelwitte banden
en kringen
yellowish-white bands and rings

4


DEUIL DE LOUIS BARTHOU

5



6

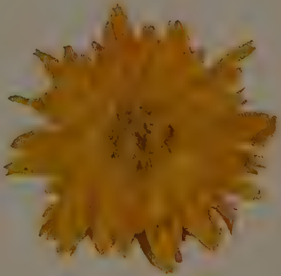
Virus b, bloem normaal, als van gezonde plant
flower normal as from a healthy plant

Virus Cu., bloem klein en verfrommeld
flower small and crumpled

Overdruk Tuinbouwgids 1953

7 Virus b op/*on* MISS WILCOX
bloem met normale kleur
(door ouderdom iets verbleekt)
flower with normal colour
(somewhat bleached, due to age)

8 Virus b op/*on* MISS WILCOX
bloem geelgestreept
flower yellow-striped



9 Virus b op/*on* MISS WILCOX
bloem van de gele „varieteit"
flower of the yellow „variety"

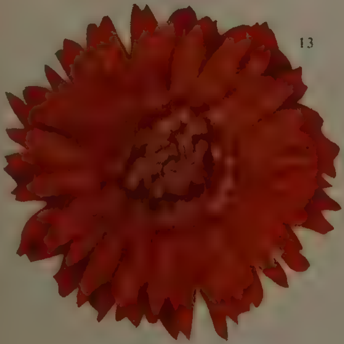
10 Virus b (soms met Cu./*sometimes with Cu.)*
op/*on* SOURCE D'OR geelgroene kringen
yellowish-green rings

11

Virus Cu. op/*on* RED ROLINDA
kleine gele of iets bruine vlekken
small yellow or brownish spots

12

Virus Cu. en b op/*on* ROYAL BRONZE
geelgestreepte bloem van plant met virus b, ziekgemaakt met Cu.
(bloem kleiner dan normaal) zelfde vergroting als 13
yellow-striped flower from plant with virus b inoculated with Cu.
(flower smaller than normal) same enlargement as 13



13

Virus b op/*on* ROYAL BRONZE
bloem normaal als van gezonde plant
flower normal as from a healthy plant

14

Virus Cu. en b op/*on* MAYFORD PINK
bruine kringen
brown rings

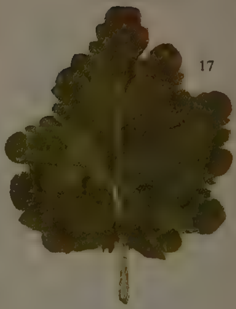
15

Virus Cu. op/*on* ROYAL BRONZE
gele verkleuring
yellow discoloration

16

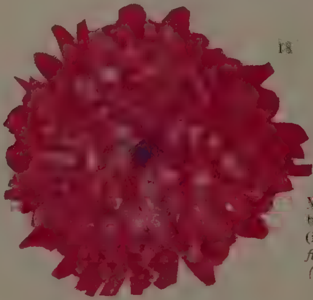
Stunt virus op/*on*
PINK LONG ISLAND BEAUTY

vage stippen
faint dots



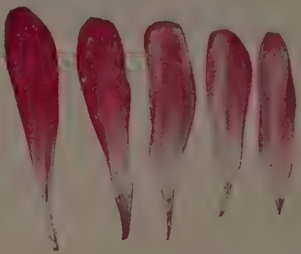
17

Virus b op/*on* PERFECTION
vage geelgroene verkleuring
faint yellowish-green discoloration



18

Virus Cu. op/*on* RUBY,
bloem wit gestreept
(is normaal effen rose)
flower white-striped
(normal flower is self pink)



19

Virus Cu. op/*on* RUBY
bloemblaadjes wit-gestreept
petals white-striped

VIRUS Cu. EN b VAN CHRYSANT OVERGEBRACHT OP TOETSPLANTEN

Virus Cu. and b from chrysanthemum inoculated on indicatorplants

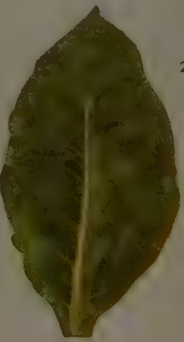
Virus b op/*on* PETUNIA HYBRIDA (geïnoculeerde bladeren) *(inoculated leaves)*

20

3 gele en 2 bruine vlekken
3 yellow and 2 brown spots

21

gele vlekken
yellow spots



22

Virus Cu. op/*on* NICOTIANA TABACUM
„White Burley" spreidsymptoom, mozaïek
systemic infection, mosaic symptoms

Fig. 23.
Chrysanthemum indicum Royal Bronze. *Links:* Uiterlijk gezonde plant met virus b. *Midden:* Plant met virus b, maar als stek geïnoculeerd met Cucumis virus 1 st. Chr.: groeiremming, randen van de binnenste lintbloemen ineengerold en met gele verkleuring. *Rechts:* Van nature sterk door Cucumis virus 1 st. Chr. aangetaste plant: sterke groeiremming, bloem klein en grotendeels geel.

Chrysanthemum indicum Royal Bronze. On the left: Apparently healthy plant with virus b. In the middle: Plant with virus b, but when a cutting, inoculated with Cucumis virus 1 st. Chr.: stunting, the margins of the inner petals curled up and with yellow. On the right: Naturally severely diseased plant with Cucumis virus 1 st. Chr.: markedly stunted, flower small and for the greater part yellow.

Fig. 24.
Petunia hybrida met Cucumis virus 1 st. Chr. Versmalling en misvorming van niet geïnoculeerde bladeren, 5 weken na sapinoculatie.

Petunia hybrida with Cucumis virus 1 st. Chr. Narrowing and malformation as systemic symptoms, 5 weeks after inoculation by sap.

Fig. 25.
Petunia hybrida met Cucumis virus 1 st. Chr. De bloemkroon is gespleten in 4 delen, 3 ervan zijn omgekeerd trechtervormig (voor de duidelijkheid is de kelk verwijderd).

Petunia hybrida with Cucumis virus 1 st. Chr. The corolla divided in 4 parts, 3 being inverted funnel shaped (for the sake of clearness the calyx has been removed).

FIG. 26. Nicotiana glutinosa, 8 weken na sapinoculatie met: *Links:* gele stam van Cucumis virus 1, No. 6 van Price. Blad bobbelig, donkerder groen en geelgevlekt, geringe groeiremming. *Midden:* Cucumis virus 1 van augurk. Blad met zwak mozaïek, matige groeiremming. *Rechts:* Cucumis virus 1 st. Chr. Blad bobbelig, geelgroen gevlekt, bladmisvorming en sterke groeiremming.

Nicotiana glutinosa. 8 weeks after sapinoculation with: On the left, Yellow strain of Cucumis virus 1, No 6 of Price. Leaf blisters and dark green and yellow spots, slight dwarfing. In the middle, Cucumis virus 1 of gherkin. Leaf with slight mosaic, moderate dwarfing. On the right, Cucumis virus 1 st. Chr. Leaf blisters and yellowish green spots, malformation and marked dwarfing.

Electronenfoto's (fig 27 en 28) van gezuiverd sap van Nicotiana tabacum „White Burley", aangetast door Cucumis virus 1 st. Chr., „Shadowcast" met goud-Mn. Vergroting 40.000 ×. Foto's vervaardigd door Mej. Dr. C. van der Scheer, Laboratorium voor Natuur- en Weerkunde te Wageningen.

Electron micrographs (fig. 27 and 28) of purified sap of Nicotiana tabacum White Burley, infected with Cucumis virus 1 st. Chr., Shadowcast with gold-Mn. Enlargement 40.000 ×. Micrographs made by Miss. Dr. C. van der Scheer, Laboratorium voor Natuur- en Weerkunde at Wageningen.

FIG. 27. De min of meer ronde deeltjes zijn 20–50 mμ in diameter.
The more or less round particles are 20–50 mμ in diameter.

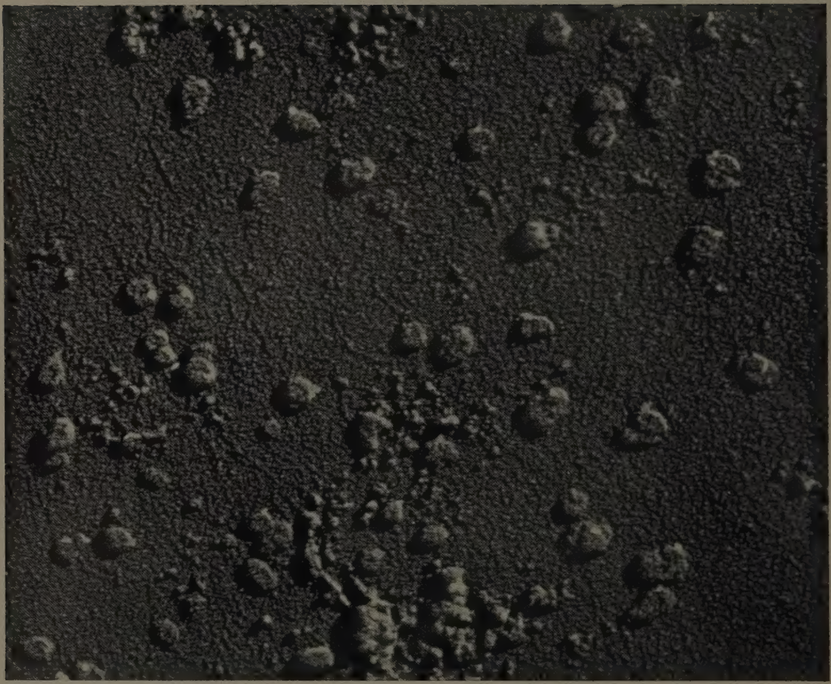


FIG. 28. De afgeplatte aggregaten van deeltjes zijn meestal 100–150 mμ in diameter. De kleinere deeltjes zijn als in fig. 27, 20–50 mμ in diameter.

The flattened aggregates of particles mostly are 100–150 mμ in diam. The smaller particles are, as in fig. 27, 20–50 mμ in diam.

Mededelingen van het Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek
Contributions of the Institute for Phytopathological Research
Binnenhaven 4*a*, Wageningen, Netherlands

No 21. BAKKER, M., Bacterievlekkenziekte in bloemkool en andere koolsoorten, veroorzaakt door Pseudomonas maculicola (McCulloch) Stevens). (Bacterial spot of clauliflower and other Brassica species, caused by Pseudomonas maculicola (McCuloch) Stevens). Tijdschrift over Plantenziekten, 57 : 75–81, 1951. Prijs f 0,25.
No 22. MULDER, D. Stenigheid in peren. (Stony pit in pear fruits). Med. Directeur van de Tuinbouw, 14: 357–361, 1951. Prijs f 0,25.
No 23. EVENHUIS, BIOL., H. H. Het nut van een bespuiting met loodarsenaat na de bloei ter bestrijding van het fruitmotje (Enarmonia [Carpocapsa] pomonella). (The benefit of calyx spraying with lead arsenate against codling moth). Med. Directeur van de Tuinbouw, 14: 265–268, 1951. Prijs f 0,25.
No 24. VAN DINTHER, J. B. M. Eriophyes gracilis Nal., als verwekker van gele bladvlekken op framboos. (Eriophyes gracilis Nal. and yellow leaf spots on raspberry). Tijdschrift over Plantenziekten. 57: 81–94, 1951. Prijs f 0,35.
No 25. GROSJEAN, J., Onderzoekingen over de mogelijkheid van een bestrijding van de loodglansziekte volgens de boorgat-methode. (Investigations on the possibility of silver-leaf disease control bij the bore-hole method). Tijdschrift over Plantenziekten, 57: 103–108, 1951. Prijs f 0,25.
No 26. DE FLUITER, H. J., THUNG, T. H., Waarnemingen omtrent de dwergziekte bij framboos en wilde braam I. (Observations on the Rubus stunt-disease in raspberries and wild black-berries I). Tijdschrift over Plantenziekten, 57: 108–114, 1951. Prijs f 0,50.
No 27. KRONENBERG, H. G., DE FLUITER, H. J., Resistentie van frambozen tegen de grote frambozenluis, Amphorophora rubi Kalt. (Resistance in raspberries to Amphorophora rubi Kalt.). Tijdschrift over Plantenziekten, 57: 114–123, 1951. Prijs f 0,35.
No 28. WALRAVE, J., Een eenvoudige methode voor de localisatie van insecten op bepaalde bladeren van een plant. (A simple method for localizing insects on special leaves of a plant). Tijdschrift over Plantenziekten, 57: 126–127, 1951. Prijs f 0,25.
No 29. BEEMSTER, A. B. R., VAN DER WANT, J. P. H., Serological Investigations on the Phaseolus Viruses I and II. Antonie van Leeuwenhoek 17:285-296, 1951. Prijs f 0,25.
No. 30 MAAN, W. J., Het gebruik van vliegtuigen in de Land- en Tuinbouw (Use of aeroplanes in agriculture and horticulture). Mededelingen Directeur van de Tuinbouw 14:586-596, 1951. Prijs f 0,35.
No 31. KUENEN, D. J., VAN DE VRIE, M., Waarnemingen over de biologie en de bestrijding van de appelzaagwesp (Hoplocampa testudinea klug. Hymenopt., tenthredinidae) (Observations on the biology and control of the apple sawfly). Tijdschrift over Plantenziekten, 57:135-157, 1951. Prijs f 0,50.
No 32. BAKKER, M., Bestrijding van de Phomopsisziekte in zaadwortels (Control of the Phomopsis-disease in seedumbels of carrot). Tijdschrift over Plantenziekten, 57:157-166a, 1951. Prijs f 0,35.
No 33. SEINHORST, J. W., BELS, P. J., Ditylenchus destructor Thorne 1945 in champignons (Ditylenchus destructor Thorne in mushrooms). Tijdschrift over Plantenziekten, 57:167-169, 1951. Prijs f 0,35.
No 34. LUCARDIE, M., Remming van de vermeerdering van Tabaksmozaïekvirus door een extract van de kernen van enkele palmsoorten (Inhibition of the multiplication of tobacco mosaic virus by an extract of the kernels of some species of palms.) Tijdschrift over Plantenziekten, 57 : 172-173, 1951. Prijs 34 en 35 samen f 0,25.
No 35. THUNG, T. H., VAN DER WANT, J. P. H., Viren en looistoffen (Viruses and tannins) Tijdschrift over Plantenziekten 57: 173-174, 1951. Prijs 34 en 35 samen f 0,25.
No 36. SCHREUDER, J. C., Een onderzoek over de Amerikaanse Vaatziekte van de erwten in Nederland (The Fusarium wilt of peas in the Netherlands). Tijdschrift over Plantenziekten, 57: 175-207, 1951. Prijs f 1,—.
No 37. GROSJEAN, J., Kruisingsproeven bij pruimen (Hybridization experiments with plums). Med. Directeur van de Tuinbouw, 14: 744-752, 1951. Prijs f 0,25.
No 38. VAN DER WANT, J. P. H., Reaction of some Nicotiana species to tobacco rattle virus World Tobacco Congress, Amsterdam, 1951, 133-139. Prijs f 0,25.
No 39. NIJVELDT, W., Over de levenswijze van Phaenobremia urticariae Kffr. (Diptera, Itonididae) f. n. sp. Entomologische Berichten, deel XIV: 8-13, 23-29, 1952. Prijs f 0,35.

No 40. Flik, H. M., Kerssen, M. C., Beknopt verslag van een proef ter bestrijding van de aardappelziekte met behulp van vernevelmachine en vliegtuig. Maandblad Landbouwvoorlichtingsdienst 9. 5. 177-183, 1952. Prijs f 0,30.

No 41. Nijveldt, W., Galmuggen van cultuurgewassen. I. Galmuggen van Fruitgewassen (Gallmidges on culturecrops. I. Gallmidges on fruitcrops). Tijdschrift over Plantenziekten, 58:61-80, 1952. Prijs f 0,75.

No 42. Mulder, D., Nutritional studies on fruit trees. II The relation between Potassium. Magnesium and Phosphorus in apple leaves. Plant and Soil, IV (2): 107-117. 1952. Prijs f 0,35.

No 43. Noordam, D., Lycopersicum-virus 3 (Tomato spotted wilt) bij enkele bloemisterijgewassen (Lycopersicum-virus 3 (Tomato spotted wilt) on some ornamental plants). Tijdschrift over Plantenziekten, 58:89-96, 1925. Prijs f 0.40

No 44. Seinhorst, J. W., Een nieuwe methode voor de bepaling van de vatbaarheid van roggeplanten voor aantasting door stengelaaltjes (Ditylenchus dipsaci (Kühn) Filipjev). Tijdschrift over Plantenziekten, 58:103-108, 1952. Prijs f 0.45

No 45. Grosjean, J., Natuurlijk herstel van loodglansziekte (Natural recovery from silverdisease). Tijdschrift over Plantenziekten, 58:109-120, 1952. Prijs f 0.35

No 46. Noordam, D., Virusziekten bij chrysanten in Nederland (Virus diseases of chrysanthemum indicum in the Netherlands). Tijdschrift over Plantenziekten, 58:121-190, 1952. Prijs f 3.—